# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

## INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/40221

10,2(0)

C12O 1/68

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

12. August 1999 (12.08.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/00716

(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1999 (03.02.99)

The second of th

(30) Prioritätsdaten:

198 04 372.4

4. Februar 1998 (04.02.98)

DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE]; Gleimstrasse 2, D-81677 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PHELPS, Robert, C. [US/DE]; Ostpreussenweg 14, D-61118 Bad Vilbel (DE). BROCKMEYER, Carsten [DE/DE]; Fellerer Strasse 2, D-85354 Freising (DE).

(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregentenstrasse 16, D-80538 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD FOR QUANTITATIVELY ANALYZING TUMOR CELLS IN A BODY FLUID AND TEST KITS SUITED **THEREFOR** 

IN **EINER** VON TUMORZELLEN OUANTITATIVEN BESTIMMUNG (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KÖRPERFLÜSSIGKEIT UND DAZU GEEIGNETE TESTKITS

### (57) Abstract

The invention relates to a method for quantitatively analyzing tumor cells in a body fluid. According to the inventive method, the test sample to be examined is first subjected to a method for accumulating or depleting tumor cells, and a reaction is carried out on the accumulated or depleted tumor cells. During the reaction, the mRNA which codes for the catalytic subunit of the telomerase is specifically amplified, and afterwards, the quantity of amplified nucleic acid is quantitatively analyzed. The invention also relates to test kits suited for the invented method.

#### (57) Zusammenfassung

Offenbart wird ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst die zu untersuchende Probe einem Verfahren zur An- bzw. Abreicherung von Tumorzellen unterzogen wird und an den angereicherten bzw. abgereicherten Tumorzellen eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierende mRNA spezifisch amplifiziert wird, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| AL  | Albanien                     | ES | Spanien                     | LS | Lesotho                     | SI  | Slowenien              |
|-----|------------------------------|----|-----------------------------|----|-----------------------------|-----|------------------------|
| ΛM  | Armenien                     | FI | Finnland                    | LT | Litauen                     | SK  | Slowakei               |
| AT  | Österreich                   | FR | Frankreich                  | LU | Luxemburg                   | SN  | Senegal                |
| ΑÜ  | Australien                   | GA | Gabun                       | LV | Lettland                    | SZ  | Swasiland              |
| AZ  | Aserbaidschan                | GB | Vereinigtes Königreich      | MC | Monaco                      | TD  | Tschad                 |
| BA  | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                    | MD | Republik Moldau             | TG  | Togo                   |
| BB  | Barbados                     | GH | Ghana                       | MG | Madagaskar                  | TJ  | Tadschikistan          |
| BE  | Belgien                      | GN | Guinea                      | MK | Die ehemalige jugoslawische | TM  | Turkmenistan           |
| BF  | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                |    | Republik Mazedonien         | TR  | Türkei                 |
| BG  | Bulgarien                    | HU | Ungam                       | ML | Mali                        | TT  | Trinidad und Tobago    |
| BJ  | Benin                        | IE | Irland                      | MN | Mongolei                    | UA  | Ukraine                |
| BR  | Brasilien                    | IL | Israel                      | MR | Mauretanien                 | UG  | Uganda                 |
| BY  | Belarus                      | IS | Island                      | MW | Malawi                      | US  | Vereinigte Staaten von |
| CA. | Kanada                       | IT | Italien                     | MX | Mexiko                      |     | Amerika                |
| CF  | Zentralafrikanische Republik | JP | Јарал                       | NE | Niger                       | UZ. | Usbekistan             |
| CG  | Kongo                        | KE | Kenia                       | NL | Niederlande                 | VN  | Vietnam                |
| CH  | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                 | NO | Norwegen                    | YU  | Jugoslawien            |
| CI  | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik | NZ | Neuseeland                  | ZW  | Zimbabwe               |
| CM  | Kamerun                      |    | Korea                       | PL | Polen                       |     |                        |
| CN  | China                        | KR | Republik Korea              | PT | Portugal                    |     |                        |
| CU  | Kuba                         | KZ | Kasachstan                  | RO | Rumānien                    |     |                        |
| cz  | Tschechische Republik        | LC | St. Lucia                   | RU | Russische Föderation        |     |                        |
| DE  | Deutschland                  | LI | Liechtenstein               | SD | Sudan                       |     |                        |
| DK  | Dānemark                     | LK | Sri Lanka                   | SE | Schweden                    |     |                        |
| EE  | Estland                      | LR | Liberia                     | SG | Singapur                    |     |                        |

Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit und dazu geeignete Testkits

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst die zu untersuchende Probe einem Verfahren zur An- bzw. Abreicherung von Tumorzellen unterzogen wird und an den angereicherten bzw. abgereicherten Tumorzellen eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierende mRNA spezifisch amplifiziert, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits.

Nahezu alle soliden malignen Tumore haben das Potential zur Metastasenbildung. Der Prozeß der Metastasierung beinhaltet die Aussaat maligner Zellen als Mikrometastasen, zumeist auf dem Blut- bzw. Lymphweg in entfernte Organe und die Ausbildung autonomer Tochtergeschwülste. Das Ausmaß der Filiarisierung bestimmt die Prognose eines Tumorleidens.

Die Ansprüche von Tumorvorsorge- oder Nachsorgeprogrammen liegen in der Früherkennung von Primärtumoren bzw. eines Rezidivs oder einer Metastasierung noch bevor Metastasen

2

klinisch manifest werden. Dieses Ziel kann bislang mit den verfügbaren apparativen Techniken nicht zufriedenstellend noch immer insbesondere gibt es werden, diagnostische Grauzone zwischen dem Nachweis zirkulierender Tumorzellen und beginnender Metastasenbildung in Organen. Durch die Frühdiagnose zirkulierender maligner Zellen z.B. im Tumornachsorgepatienten Blut eines peripheren manifesten einer d.h. noch vor frühzeitig, möglicherweise kurative Organmetastasierung, eine Immunmodulations- oder Polychemotherapie eingeleitet werden. Die Quantifizierung der Tumorzellen im peripheren Blut vor und nach der Therapie stellt dabei eine wichtige Kontrolle dar.

Die Lebensdauer eukaryontischer Zellen wird entsprechend der der Termini Länge die Telomer-Hypothese durch chromosomalen DNA, der Telomere, bestimmt. Telomere spielen deshalb nach dieser Theorie die Rolle einer mitotischen Uhr. Bedingt durch den Replikationsmechanismus der DNA-Polymerasen werden die Telomere nach jeder Zellteilung um die Länge des Replikationsprimers verkürzt. Dadurch werden die Chromosomen jeder Zellteilung kürzer und erreichen nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen eine kritische Länge. Die Zellen gehen dann in eine seneszente Phase über, in der sie sich nicht mehr teilen und schließlich absterben. In einigen Fällen kann jedoch dieser Regulationsmechanismus durch ein Ribonukleoprotein, die Telomerase, übergangen werden und die Zellen werden immortal. Die Telomerase synthetisiert die bei der Feplikation verlorengegangenen Telomersequenzen an das RNA-Komponente die Chromosomen, wobei 5'-Ende der Proteins (human Telomerase RNA component, hTR) als Matrize dient und ein Teil der Proteinkomponente die katalytische Untereinheit (human Telomerase Reverse Transcriptase, hTRT) bildet.

3

Zellen mit aktiver Telomerase und unbegrenzter Lebensdauer im Menschen gehören vor allem die Keimzellen und hämatopoetischen Stammzellen, die sich während der gesamten Lebenszeit eines Individuums teilen können. Darüber hinaus werden auch in aktivierten B- und T-Lymphozyten des Menschen gefunden. Neben Telomerase-Aktivitäten erhöhte normalen physiologischen Rolle der Telomerase kann in etwa eine Tumorgeweben menschlichen 90-95% aller kann werden. Daher gefunden Telomerase-Aktivität Telomerase-Aktivität von Tumorzellen die Grundlage für ein Nachweissystem für disseminierte zirkulierende Tumorzellen in Körperflüssigkeiten bilden, die potentiell zu Metastasen führen können.

Ribonukleoprotein mit reverser ist ein Telomerase Die Transkriptaseaktivität [Shippen-Lentz et al. (1990), Science 247: 546], das als Matrize eine integrale RNA-Sequenz zur unabhängigen DNA-Synthese benutzt [Greider et al. (1989). Nature 337: 331], mit der neue telomere DNA an die Enden der Chromosomen synthetisiert werden. Telomere bestehen aus hoch Tandemsequenzen von (TTAGGG)n konservierten Kilobasen (kb) Länge/Zellgenom und haben die Aufgabe die Chromosomen an der Kernmembran zu stabilisieren und schützen unkontrollierter vor DNA genomische kodierende Rekombination und Degradation [Mehle et al. (1994). Cancer 54: 236]. Während in den niederen Eukaryonten Verkürzung zwischen Gleichgewicht dynamisches Chromosomenenden und der de novo Synthese von telomeren Sequenzen durch die Telomerase postuliert wird, normale humane somatische Zellen eine niedrige oder nicht Darüber hinaus ist die nachweisbare Telomeraseaktivität. nicht DNA Enzymen im Gegensatz zu anderen Telomerase wachstumsreguliert, denn keine der aktiv proliferierenden Zellkulturen zeigte nachweisbare Telomeraseaktivität. Einzig Keimzellen und fast alle Tumorzellinien [Ohyashiki et al.

4

(1994). Cancer Genet Cytogenet 78: 64; Rogalla et al. (1994). Cancer Genet Cytogenet 77: 19; Schwartz et al. (1995). Cancer 75: 1094] und Tumorgewebe (Lunge, [Hiyama et al. (1995). Oncogene 10: 937; Shirotani et al. (1994). Lung Cancer 11: 29], Nieren [Mehle et al. (1994). Cancer Res 54: 236], Ovarien [Chadeneau et al. (1995). Cancer Res 55: 2533] und Blut [Counter et al. (1995). Blood 85: 2315]) zeigen meßbare Telomeraseaktivität und eine konstante Telomerlänge, Zellteilungen hindurch von durch eine unendliche Zahl beibehalten wird. Daher kann die Aktivierung der Telomerase mit der damit verbundenen Stabilisierung der Telomerlängen als kritischer Schritt in Richtung Immortalisierung von somatischen Zellen gewertet werden.

Feng et al. gelang die Klonierung der integralen RNA-Sequenz der humanen Telomerase (hTR), die auf dem distalen Segment (q) von Chromosom 3 kodiert wird. Die Autoren konnten mittels (PCR) Polymerase-Kettenreaktion kompetitiver Telomeraseexpression in der signifikante Erhöhung Tumorgeweben sowie in den Keimgeweben gegenüber normalen somatischen Zellen belegen [Feng et al. (1995), Science 269: 1236]. Ein Antisense-Konstrukt der hTR-Sequenz verursachte den Zelltod (Apoptose) in transfizierten HeLA-Zellen. Diese Daten belegen die stringente Repression der Telomerase in somatischen Geweben als auch die Tatsache, daß malignes Wachstum von der Präsenz immortaler Zellen und von der Aktivierung der Telomerase abhängig ist.

charakterisierten 1997 einen al. et Nakamura katalytischen Untereinheit der Proteinbestandteil menschlichen Telomerase. Im Vergleich mit der RNA-Komponente der menschlichen Telomerase (hTR) korreliert die für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase (hTRT) der mit stärker wesentlich mRNA kodierende Telomeraseaktivität (Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB,

PCT/EP99/00716 WO 99/40221

(1997): Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. Science 277: 955-9) und ist damit besser zur Krebsdiagnostik geeignet. Meyerson et al. lokalisierten die hTRT auf dem menschlichen Chromosom 5p und bestätigten die mRNA-Nachweises hTRT Korrelation des starke enzymatischen Aktivität der menschlichen Telomerase (Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA (1997): hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. Cell 90: 785-95).

katalytischen Bestimmung der Standardmethode zur Die Aktivität der Telomerase ist z.Zt. der TRAP-Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol) [Kim et al. Science (1994) 266: 2011]. Dabei synthetisiert die im Zellextrakt vorhandene Telomerase Extensionsprodukte, die anschließend in einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifiziert werden. Eine densitometrische Auswertung der anschließend erlaubt Amplifikationsprodukte Quantifizierung der Telomerase-Aktivität. Die Sensitivität des TRAP-Assays wurde in Abhängigkeit des Probenmaterials, des Versuchslabors und des verwendeten Protokolls mit 4-100 Zellen/Ansatz angegeben. Da im TRAP-Assay der Rohextrakt von lysierten Zellen bzw. Geweben verwendet wird, Methode im hohen Maße störanfällig gegenüber Inhibitoren der in der PCR verwendeten DNA-Polymerase (Taq-Polymerase).

Der TRAP-Assay wird beispielsweise in der WO 98/02581 zur Diagnose von präkanzerösen oder kanzerösen Schäden des Cervix, Endocervix, der Vagina oder Vulva eingesetzt.

Die WO 97/18322 offenbart ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen, bei dem zuerst mit der zu untersuchenden Probe eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die RNA-Komponente der Telomerase spezifisch amplifiziert wird, und

anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird.

Die WO 96/01835 offenbart ebenfalls ein Verfahren zum Nachweis der RNA-Komponente der Telomerase in Zellen oder Zellproben.

Trotz der bekannten Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen besteht weiterhin ein Bedürfnis nach zuverlässigen und einfachen Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in Körperflüssigkeiten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem man Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit quantitativ bestimmen kann.

Verfahren zur ein betrifft daher Erfindung Die Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst die zu untersuchende Probe einem Verfahren zur An- bzw. Abreicherung von Tumorzellen unterzogen wird und an abgereicherten Tumorzellen eine angereicherten bzw. Reaktion durchgeführt wird, bei der die für die katalytische spezifisch Telomerase kodierende mRNA Untereinheit der amplifiziert, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits.

Bei der Körperflüssigkeit, in der Tumorzellen quantifiziert werden sollen, kann es sich um jede menschliche oder tierische Körperflüssigkeit oder um eine Dispersion von Zellgewebe handeln. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Blut, insbesondere peripheres Blut wie venöses oder arterielles Blut, Lymphe, Urin, Stuhl, Exsudate, Transudate, Spinalflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Speichel, Flüssigkeiten aus natürlichen oder unnatürlichen Körperhöhlen, Knochenmark und dispergiertem Körpergewebe. Bei den Flüssigkeiten aus

7

natürlichen Körperhöhlen kann es sich beispielsweise um seröse Flüssigkeiten wie Peritoneal- und Pleuraflüssigkeiten handeln, bei den Flüssigkeiten aus unnatürlichen Körperhöhlen kann es sich beispielsweise um Flüssigkeiten aus Zysten handeln.

Bevorzugte Körperflüssigkeiten sind Blut, Knochenmark, Lymphe, seröse Flüssigkeiten aus Körperhöhlen sowie Urin, wobei Blut und Urin besonders bevorzugt sind. Urin eignet sich insbesondere zur Anreicherung von Zellen von Blasentumoren.

Beispielsweise wird peripheres Blut durch Punktion einer Arterie, Vene oder Fingerkuppe dem Probanden entnommen und nach einem Anreicherungs- bzw. Abreicherungsverfahren, die in der Probe enthaltenen Tumorzellen in einen RNA-Lysispuffer der beispielsweise Harnstoff oder vorzugsweise Guanidinium Isothiocyanat enthält, überführt, um eventuell vorhandene RNasen zu denaturieren und die Nukleinsäuren aus den Zellen freizusetzen [siehe z. B. Chomczynski et al. (1987) Anal. Biochem. 162, 156]. Die Isolierung der Nukleinsäuren aus dem RNA-Lysispuffers des salzhaltigen Medium beispielsweise mittels Siliciumdioxid-Partikel erfolgen, an die sämtliche Nukleinsäuren binden können [Boom et al. (1990) J. Clin. Microbiol., 29, 495]. Danach werden die Partikel mit geeignetem Puffer mehrmals gewaschen und die gebundenen Nukleinsäuren eluiert. Anschließend ist es vorteilhaft die in der Probe eventuell vorhandene genomische DNA mittels RNasefreier DNase in einem geeigneten Puffer zu hydrolysieren, die für Amplifizierung der späteren bei der damit katalytische Untereinheit der Telomerase kodierenden mRNA bzw. ein Ergebnisse falsch-positiven falsche Amplifizierungssignale durch Hintergrundrauschen entstehen. vorhandener DNA noch eventuell aufgrund Anschließend erfolgt im allgemeinen eine Inaktivierung der

8

DNase beispielsweise durch Phenolextraktion und/oder Hitzedenaturierung. Vor oder vorzugsweise nach Behandlung der Probe mit DNase kann vorteilhafterweise noch eine weitere Reinigung der in der Probe vorhandenen RNA beispielsweise mittels chromatographischer Methoden wie die Ionenaustausch-Chromatographie vorzugsweise an Kieselgel erfolgen.

Zur Kontrolle, ob noch eventuell störende genomische DNA in anschließend kann ist, vorhanden Probe der beschriebenen unten Amplifizierungsreaktion mit den Telomerase-spezifischen Oligonukleotid-Primern durchgeführt werden, wobei die in der Probe vorhandene RNA vorher nicht in cDNA durch eine reverse Transkriptionsreaktion umgeschrieben Nur für den Fall, daß die Probe frei ist von Telomerase-spezifischer DNA erfolgt keine Amplifikation mit der Folge, daß keine amplifizierte DNA gemessen werden kann.

Anschließend erfolgt eine Umschreibung der in der Probe vorhandenen RNA in cDNA im allgemeinen mit Hilfe der reversen VMA der mit Transkriptionsreaktion В. z. Das Verfahren ist allgemein bekannt und Transkriptase. beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 beschrieben. In einer bevorzugten Ausführungsform der reversen Transkription kann auch eine thermostabile RNAabhängige DNA Polymerase, wie in WO 90/07641 beschrieben, verwendet werden. Als Oligonukleotid-Primer für die reverse Transkriptase eignen sich beispielsweise vorteilhafterweise die unten beschriebenen Oligonukleotid-Primer oder Random Primer einer bestimmten Länge.

Die anschließende Amplifizierung kann beispielsweise mit einer DNA-Polymerase z.B. nach der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt werden (siehe z.B. U.S. Patente Nr. 4,683,195; 4,683,202; 4,965,188) oder vorzugsweise mit einer

9

isothermalen В. der nach z. RNA-Polymerase (NASBA). Amplifikation Nukleinsäuresequenz-basierenden jedem Fall benötigt man für die Amplifizierung spezifische amplifizierenden zu Oligonukleotid-Primer, die der von Nukleinsäure abgeleitet sind. Bei der vorliegenden Erfindung Sequenzabschnitt der beliebige jeder kann katalytische Untereinheit der Telomerase kodierenden cDNA für die Synthese der Oligonukleotid-Primer verwendet werden. Vorzugsweise sind die Oligonukleotid-Primer ca. 20 bis ca. Nukleotide lang. 35 vorzugsweise ca. bis 25 Amplifikationsprodukt ist im allgemeinen ca. 100 bis ca. 2000 Basen, vorzugsweise ca. 200 bis ca. 1500 Basen, insbesondere ca. 450 bis ca. 550 Basen lang. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sind insbesondere folgende Oligonukleotid-Primer bevorzugt, die aus der Sequenz gemäß Abb. 1 abgeleitet wurden:

5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder 5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTTCTG 3' (hTRT2),

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können. Der Oligonukleotid-Primer hTRT1 entspricht dem 5'-Primer und hTRT2 dem 3'-Primer. Das Amplifikationsprodukt ist 513bp lang. Die Primer können beispielsweise synthetisch nach der Triestermethode hergestellt werden [Matteucci et al., (1981), J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191]. Als DNA-Polymerase kann beispielsweise eine nicht-thermostabile DNA-Polymerase wie die T4 DNA Polymerase, T7 DNA Polymerase, E. coli Polymerase I oder das Klenow Fragment von E. coli oder vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase wie die Taq-Polymerase (siehe z. B. U.S. Patent Nr. 4,889,818) verwendet werden.

Das allgemeine Prinzip der PCR-Reaktion besteht nun darin, daß während mehrerer sich wiederholender Reaktionszyklen die

10

DNA hitzedenaturiert wird und in Anwesenheit geeigneter Oligonukleotid-Primer mit gegenseitiger Orientierung der Einzelstrang mit Hilfe der DNA-Polymerase zum Doppelstrang wieder ergänzt wird. Danach wird der Zyklus wiederholt bis sich genügend DNA zur Quantifizierung nach einer der unten beschriebenen Methoden gebildet hat. Im allgemeinen sind ca. 20 bis ca. 40 Zyklen, vorzugsweise ca. 30 bis ca. 35 Zyklen ausreichend.

genannt) wird 3SR-System NASBA-Methode (auch Bei der Oligonukleotid-Primer, vorzugsweise ein zumindest verwendet, der einen Promotor für die RNA vorzugsweise für die T7 RNA Polymerase enthält [siehe z. B. Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1874-1878 oder Kievits et al. (1991), J. Virol. Methods, 35, 273-286]. Zuerst wird, wie oben bereits näher beschrieben, die RNA mit Hilfe eines der oben beschriebenen Oligonukleotid-Primer und einer reversen Transkriptase, vorzugsweise der AMV umgeschrieben. Das CDNA in Transkriptase, reversen Reaktionsprodukt ist ein RNA: DNA-Doppelstrang, dessen RNA-Komponente anschließend mittels einer RNase, vorzugsweise der RNase H, zu einem DNA-Einzelstrang abgebaut wird. Verwendung eines der oben beschriebenen Oligonukleotid-Primer wird der DNA-Einzelstrang mittels einer DNA Polymerase zum DNA-Doppelstrang ergänzt. Als DNA Polymerase eignet sich vorzugsweise wiederum die AMV reverse Transkriptase, da diese RNA-abhängige DNA eine nur nicht Transkriptase Polymeraseaktivität, sondern auch eine DNA-abhängige DNA Polymeraseaktivität besitzt. Das Reaktionsprodukt ist ein DNA-Doppelstrang, der den Promotor für z. B. die RNA RNA Anschließend synthetisiert enthält. Polymerase Polymerase wieder einen sogenannten "antisense" RNA-Strang und der Zyklus kann von neuem beginnen. Im allgemeinen sind ca. 20 bis ca. 40 Zyklen, vorzugsweise ca. 30 bis ca. 35 genügend Amplifikationsprodukt, ausreichend, Zyklen um

11

vorzugsweise "antisense" RNA, für die anschließende Quantifizierung zu liefern.

Für die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte können interkalierenden mit beispielsweise diese Ethidiumbromid beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffen wie Agaroseeinem в. in z. und direkt Polyacrylamidgel unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Da die zu quantifizierenden Amplifikationsprodukte jedoch nur dann in direkter Korrelation zu der eingesetzten Menge RNA wenn sich die Amplifikations-Reaktion in einer Zwecke der befindet, zum ist Phase linearen Reaktionsverlauf notwendig, den Quantifizierung Amplifizierung zu messen. Dazu müssen die Reaktionsprodukte nach jedem Zyklus der Amplifizierung gemessen werden, wobei anhand des Reaktionsverlaufs der lineare Bereich bestimmt wird, in welchem dann mit hinreichender Sicherheit eine Es Quantifizierung vorgenommen werden kann. vorteilhaft, wenn die Amplifikationsprodukte bereits während und die Kinetik der der Amplifizierung markiert werden, des während schon kontinuierlich Amplifikation Dies wird wird. gemessen Amplifikationsvorganges beispielsweise bei der TaqMan<sup>TM</sup>-PCR (Hoffmann-La Roche) mit Hilfe einer für das Amplifikationsprodukt spezifischen Sonde durchgeführt. Die Sonde ist an ihrem 3'- und 5'-Ende mit ("Reporter" Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlichen "Quencher") markiert und liegt während der gesamten PCR im die Bedingt durch vor. Reaktionsgefäß Exonukleaseaktivität der zur Amplifizierung verwendeten DNA-Polymerase (AmpiTaq<sup>TM</sup>, Hoffmann-LaRoche) wird während der Verlängerung des DNA-Tochterstranges die Sonde hydrolysiert und dabei der Quencher vom Reporter getrennt. Dadurch wird der Quencheffekt aufgehoben und die vom "Reporter" emittierte

12

charakteristische Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Intensität dieser Fluoreszenz ist direkt proportional zu den PCR-Produkten, die pro Synthese-Zyklus amplifiziert wurden.

Als Markierungen eignen sich beispielsweise auch radioaktive Fluoreszenz-Biotinmarkierungen, Markierungen, Markierungen Elektrochemolumineszenz(ECL)markierungen. Die tragen in der Regel die Nukleotide als Ausgangsstoffe für die DNA- oder RNA-Polymerase. Amplifizierung durch die radioaktiv markierten Amplifikationsprodukte (z. B. PCR- oder NASBA-Produkte) können durch Messung der Radioaktivität, die Biotin-markierten Amplifikationsprodukte über einen Avidindie Farbstoff, Streptavidin-tragenden einem Amplifikationsprodukte mit fluoreszenzmarkierten elektrochemolumineszenz-markierten die und Fluorometer Amplifikationsprodukte mit einem ECL-Detektor nachgewiesen werden. Die am meisten bevorzugte Nachweismethode ist jedoch die automatische in vitro Hybridisierung, z.B. wie bei der TaqMan<sup>TM</sup>-PCR, schon während des Amplifikationsvorganges.

"Echt-Zeit"-Quantifizierung Unterschied zur Produkten wie bei der Taq $Man^{TM}$ -PCR ist es auch möglich PCR-Produkte mit Hilfe von Verdünnungsreihen zu quantifizieren. entsprechende die bzw. die RNA wird Dabei verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt. Dadurch erhält man ähnlich wie bei der "Echt-Zeit"-Quantifizierung eine sigmoidale Reaktionskinetik bei der wiederum im linearen proportional Amplifikationsprodukte Bereich Ausgangsmaterial vorliegen. Der Nachweis der PCR-Produkte Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten oder wird mit radioaktiv-markierten Desoxynukleotiden durchgeführt, die von der DNA-Polymerase während der Amplifizierung direkt in die Desweiteren werden werden. eingebaut PCR-Produkte zur PCR der bei Primer, die Oligonukleotide (sog. Initialisierung der Synthese des Tochterstranges notwendig sind und nach der PCR in allen Amplifikationsprodukten am 5'-

13

und 3'-Ende der DNA eingebaut vorliegen) mit bestimmten die Biotin), um (beispielsweise markiert Molekülen von mit Hilfe PCR der Amplifikationsprodukte nach spezifischen Antikörpern oder Streptavidin zu immobilisieren. beispielsweise kann Immobilisierung einer in der dann mit Hilfe Mikrotiterplatte erfolgen, die die spezifischen Sonde, Molekül-markierten Enzymeines hybridisiert, und Amplifikationsprodukte gekoppelten (beispielsweise einer Peroxidase) Antikörpers gegen das Markermolekül der Sonde eine Farbreaktion erfolgt. Diese Farbreaktion läßt sich anschließend photometrisch erfassen.

Das Oligonukleotid für einen Nachweis durch die in vitro Hybridisierung trägt im allgemeinen die oben beschriebenen NASBAmit Verbindung wobei in Markierungen, Hybridisierungsprobe eine Amplifizierungsmethode die vorzugsweise eine Elektrochemolumineszenzmarkierung, Tris[2,2-bipyridin]ruthenium[II]-Komplexmarkierung tragen kann [siehe z. B. van Gemen et al. (1994), J. Virol. Methods, 49, 157-168].

Quantifizierung der sensitive und genaue Eine Amplifikationsprodukte kann vorteilhafterweise auch dadurch erreicht werden, daß eine bestimmte Menge von einer oder mehreren bekannten Nukleinsäuren (Standard-Nukleinsäuren) coamplifiziert wird [siehe z. B. van Gemen et al. (1993), J. Virol. Methods, 43, 177-188]. Hierbei wird zu den unbekannten Mengen der zu untersuchenden Probe eine unterschiedliche, jedoch genau bekannte Menge der co-amplifizierenden Standard-Nukleinsäure bzw. -Nukleinsäuren beispielsweise in Form einer Verdünnungsreihe hinzugegeben und die Amplifikationsprodukte mehrerer co-amplifizierender einer oder Probe und Standard-Nukleinsäuren in unabhängigen Ansätzen quantitativ bestimmt. Ein Vergleich der Meßergebnisse ergibt die Menge

14

der zu bestimmenden für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierenden mRNA in der Probe.

Vorteilhafterweise wird die co-amplifizierende Standarddemselben -Nukleinsäuren mit bzw. Nukleinsäure Oligonukleotid-Primer amplifiziert wie die zu untersuchende Amplifikationsprodukte haben die wesentlichen die gleiche Länge. Besonders bevorzugt haben die co-amplifizierenden Nukleinsäuren dieselbe Sequenz wie das Amplifikationsprodukt der zu bestimmenden Probe mit Ausnahme von ca. 20 Nukleinsäuren zwischen den Oligonukleotid-Primerjedoch bekannte die eine willkürliche, Bindungsstellen, bestimmende zu das können Dadurch tragen. Sequenz covon dem Probe in der Amplifikationsprodukt amplifizierenden Amplifikationsprodukt beispielsweise eine Hybridisierung, wie z. B. bei Sambrook et al. (supra) näher beschrieben, mit entsprechend komplementären markierten Oligonukleotiden unabhängig voneinander quantifiziert werden. Insbesondere ist es vorteilhaft, wenn mehrere, vorzugsweise Nukleinsäuren verschiedene co-amplifizierende drei, unterschiedlichen Konzentrationen der Probe zugesetzt werden, da hierdurch die Zahl der sonst einzeln durchzuführenden Amplifizierungsreaktionen reduziert werden kann [siehe van Gemen et al. (1994) J. Virol. Methods 49, 157-168]. Es ist co-amplifizierenden bevorzugt, die insbesondere auch beschriebenen oben dem bereits zu Nukleinsäuren Lysispuffer hinzuzugeben, da hierdurch der Einfluß möglicher Nukleinsäureverluste bei der nachfolgenden Aufarbeitung der Probe ausgeschlossen werden kann.

Als co-amplifizierende Standard-Nukleinsäuren gemäß der vorliegenden Erfindung eignen sich vorteilhafterweise RNA-Einzelstrang-Sequenzen, die durch in vitro Transkription beispielsweise mit der Sp6 oder T7 RNA Polymerase von Konstrukten hergestellt werden, die DNA oder cDNA der zu

15

amplifizierenden Probe enthalten und die jeweils mit einem randomisierten Sequenzaustausch von beispielsweise ca. 10 bis ca. 30, vorzugsweise ca. 20 Nukleotiden ausgestattet sind.

einem bevorzugterweise aus bestehen Konstrukte Die Transkriptionsvektor mit einer Bindungsstelle für die Sp6 oder T7 RNA Polymerase zwischen einer sogenannten "Multiple DNA oder cDNA in welcher die Site", Durch eine amplifizierenden Probe kloniert ist. worden Restriktionsendonukleasen, Hydrolyse mit selektive verschiedenen zwei vorzugsweise mit Sequenz klonierte die Restriktionsendonukleasen, kann bestimmten Länge Stück einer ein geöffnet und langes gleich ein durch herausgeschnitten und beispielsweise mit Hilfe der T4 Ligase ersetzt werden. Das klonierte Stück kann einen Sequenzaustausch beliebiger Länge, beispielsweise ca. 10 bis ca. 30, vorzugsweise ca. Nukleinsäuren enthalten und liegt vorzugsweise zwischen den Diesen Vorgang kann Oligonukleotid-Primer-Bindungsstellen. man wiederholen, um an gleicher Stelle Insertionen mit anderen Nukleinsäure-Sequenzen vorzunehmen. Lassen sich keine geeigneten Schnittstellen finden, z. B. weil auch im Vektor geschnitten wird, müssen künstliche Schnittstellen geschaffen werden. Dies kann beispielsweise mittels rekombinanter PCR geschehen, die im wesentlichen bei Higuchi et al. [Higuchi, R. (1988). Nucleic Acid Res 16: 7351-7367; Higuchi, (1990). M. Innis A. et al. eds. San Diego, New York, Berkley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press, Inc. der vorliegenden im experimentellen Teil 177-1831 und Erfindung beschrieben ist.

Eine bevorzugte Verwendung im Rahmen der Erfindung finden in vitro transkribierte RNA-Einzelstrang-Sequenzen von Konstrukten, welche

16

a) die gesamte cDNA entsprechend der für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase kodierenden mRNA enthalten und

b) in welchen ein randomisierter Sequenzaustausch von ca. 20 Nukleotiden eingeführt worden ist.

Da sich die Standard-Nukleinsäuren (beispielsweise hTRTKa, hTRTKb und hTRTKc) untereinander und von der Wildtyp-Sequenz beispielsweise nur durch eine randomisierte und bekannte 20 Basenpaar lange Sequenz unterscheiden, können die Amplifikationsprodukte der Standard-Nukleinsäuren und der Wildtyp-Sequenz durch komplementäre Bindung von markierten Oligonukleotiden in vier getrennten Ansätzen nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der amplifizierten "antisense" RNA, werden die entsprechenden reverse komplementären Sequenzen verwendet.

Danach werden die individuellen Amplifikationsmengen von dem Wildtyp- und den Standard-Nukleinsäuren bestimmt. Im Vergleich zu den unterschiedlichen Amplifikationsmengen der Standard-Nukleinsäuren bei bekannter Ausgangsmenge (z. B. hTRTKa: 10<sup>2</sup>, hTRTKb: 10<sup>4</sup> und hTRTKc: 10<sup>6</sup> Moleküle) läßt sich die unbekannte Ausgangsmenge der Wildtypsequenz errechnen. Daraus läßt sich dann auf die Anzahl der Metastasen pro abgenommener Körperflüssigkeit schließen.

Als interne positive Kontrolle des Verfahrens und der zu untersuchenden Probe kann zusätzlich eine Nukleinsäure amplifiziert und nachgewiesen werden, die im allgemeinen immer in einer Körperflüssigkeit vorkommt. Als geeignete Nukleinsäuren sind beispielsweise die mRNA kodierend für ß-Globin oder für die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) zu nennen (siehe z. B. GB 2 260 811), die immer in

17

den Zellen der Körperflüssigkeit vorkommen. Geeignete Oligonukleotid-Primer für die humane ß-Globin mRNA sind beispielsweise Primer mit den Sequenzen:

- 5' ACCCAGAGGT TCTTTGAGTC 3' (Glob 1) und
- 5' TCTGATAGGC AGCCTGCACT 3' (Glob 2).

Weitere interne positive Kontrollen des Verfahrens und der zu untersuchenden Probe können zusätzlich zellspezifische Nukleinsäuren, wie ß-Aktin mRNA, mit den Primern (Nakajima-Iiji, S., Hamada, H., Reddy, P., Kakanuga, T. (1985): Molecular structure of the cytoplasmatic ß-actin gene: Interspezies homology of sequences in the introns. Proc Natl Acad Sci USA 82, 6133-7):

5' GATGATGATATCGCCGCGCTCGTC 3' (Act 1)
5' CTCAAACATGATCTGGGTCATCTTC 3' (Act 2)

oder T-Zell spezifische Nukleinsäuren, wie die mRNA des T-Zell-Rezeptors, mit den Primern (Toyonaga, B., Yoshikai, Y., Vadasz, V., Chin, B., Mak, T.W. (1985): Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region of the human T-cell receptor ß chain. Proc Natl Acad Sci USA 82, 8624-8):

- 5' GAGGTCGCTGTTTTGAGCCATCAGAAG 3' (TCR 1)
- 5' GATCTCATAGAGGATGGTGGCAGACAG 3' (TCR 2)

sein.

Die Oligonukleotid-Primer können gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten.

Zur Vermeidung bzw. Reduzierung falsch positiver Ergebnisse bzw. des sogenannten Hintergrundrauschens, das durch

18

Nicht-Telomeraseaktivitäten von vorhandene eventuell Tumorzellen verursacht wird, wird die zu untersuchende Probe Verfahren zur Anzunächst einem erfindungsgemäß Hierzu ist Abreicherung von Tumorzellen unterzogen. Körperflüssigkeit entnommene vorteilhaft, die entsprechenden Verfahren entweder aufzureinigen oder Konditionen zu kultivieren, die für die kontaminierenden Telomerase-positiven Nicht-Tumorzellen ungünstig, jedoch für die vorhandenen Tumorzellen günstig sind.

Im Falle der Aufreinigung sollen insbesondere aus der zu aktivierte und/oder Stammzellen Probe untersuchenden angereichert Tumorzellen abgereichert oder Immunzellen werden. Da in der Regel die einzelnen Zellen spezifische Abtrennung eine besitzen ist Oberflächenmarker Anreicherung der Zellen über die Immunabsorption besonders vorteilhaft. Als Methoden eignen sich beispielsweise die magnetische (MACS) oder die fluoreszenzaktivierte (FACS) Zellsortierung [siehe z. B. Göttlinger & Radbruch (1993) mta, 8, 530-536, No. 5]. So können hämatopoetische Stammzellen beispielsweise über ihren Oberflächenmarker CD34 mittels MACS von der Blutprobe abgetrennt werden [Kato & Radbruch (1993) Cytometry, 14, 384-392]. B-Zellen lassen sich beispielsweise über ihre Oberflächenmarker CD10, CD19 und/oder CD20 und T-Zellen über CD45RA und/oder CD7 abtrennen. Tumorzellen können über ihre spezifischen Tumormarker, z. B. CEA, angereichert werden. Neben MACS oder FACS eignen sich auch besonders an sogenannte käuflich erhältliche Magnetbeads (z. B. Dynabeads gegen die Antikörper gebundene Corp.) Dynal M450, Abreicherung oder Oberflächenmarker zur spezifischen Anreicherung der entsprechenden Zellen.

Die Isolierung mononukleärer Zellen kann nach folgenden Methoden erfolgen:

PCT/EP99/00716 WO 99/40221

19

(Bsp.

Erythrozyten der Lyse spezifische Ammoniumchlorid/hypertonischer Schock), spezifische Lyse mononukleärer Blutzellen (Bsp. L-Leucyl-L-Leucine-Methylester für Monozyten und zytotoxische Zellen), spezifischer mittels Selektion negativ/positiv Oberflächenmarker (Bsp. negativ: CD 4, 8, 34 etc.; positiv: Ber-EP4, AUA1, CEA), aneuploider Dichtegradienten-Zentrifugation euploider vs.

Zellen oder

Dichtegradienten-Zentrifugation von mononukleären kernlosen Zellen (Bsp. Ficoll).

In den 60er- und 70er-Jahren, als Methoden wie beispielsweise FACS oder MACS noch nicht zur Verfügung standen, wurden aufgrund Tumorzellen von hämatopoetischen Zellen unterschiedlichen Dichte getrennt (J.A. Fleming et al., J. clin. Path. (1967), 20, 145). Entsprechend dieser Daten besitzen Tumorzellen eine spezifische Dichte von 1,040-1,080, während Erythrozyten und polymorphnukleäre Leukozyten eine höhere Dichte aufweisen. Lymphozyten weisen hingegen eine spezifische Dichte im Bereich von 1,060-1,075 auf überschneiden sich somit mit der spezifischen Dichte von Eine vollständige Abtrennung der ebenfalls Tumorzellen. Telomerase-aktiven Lymphozyten von den Tumorzellen über deren Dichteunterschiede sollte somit nicht möglich sein. So zeigte auch die Verwendung einer Standardlösung zur Isolierung von Lymphozyten, wie z.B. Histoprep' mit einer Dichte von 1,077 g/ml, daß Lymphozyten von gesunden Blutspendern mit einer Dichte von bis zu 1,077 g/ml eine Telomerase-Aktivität aufweisen.

Ausführungsform bevorzugte besonders eine Für erfindungsgemäßen Verfahrens wurde nun gefunden, daß Anreicherung der Tumorzellen dadurch erfolgen kann, daß man ein Zellseparationsmedium mit einer Dichte im Bereich von

PCT/EP99/00716 WO 99/40221

20

1,055 bis < 1,070 g/ml mit der Körperflüssigkeit, die die Tumorzellen enthält, überschichtet und zentrifugiert. Durch die Verwendung des speziellen Zellseparationsmediums werden Zellen vorhandenen Körperflüssigkeit der

aufgetrennt, daß die aufgrund ihrer Dichte zusammen mit den angereicherten Lymphozyten keine Tumorzellen Aktivität aufweisen.

die

ein verwendet Anreicherungsverfahren Das Zellseparationsmedium als diskontinuierlichen Gradienten, das überschichtet wird. Körperflüssigkeit spezifischen werden Zellen ihrer die Zentrifugation einzelnen in und können aufgetrennt Zelldichte nach Fraktionen abgenommen werden. Der spezifische Dichtegrad des Zellseparationsmediums erlaubt eine fast vollkommene Trennung Körperflüssigkeiten in den den von Tumorzellen befindlichen korpuskulären Anteilen, speziell den Zellen des roten und weißen Blutsystems. Darüber hinaus erlaubt es das Telomerase-negativen Telomerase-positive von Verfahren, trennen, wobei hämatopoetischen Zellen zu angereicherten Tumorzellen nach der Zentrifugation in der Telomerase-negativen die befinden wie gleichen Fraktion anschließend eine daß Zellen, so hämatopoetischen Fraktion Telomerase-Expression dieser in nachgewiesene zweifelsfrei auf vorhandene Tumorzellen zurückgeführt werden kann.

Überraschend ist auch, daß durch die gegenüber dem Stand der des Dichte der geringfügige Verringerung Technik Reduzierung erhebliche Zellseparationsmediums eine kontaminierenden Blutzellen erreicht wird. Dadurch wird die Gesamt-Zellzahl signifikant verringert, ohne daß signifikante Verluste an Tumorzellen auftreten, wodurch z.B. das Screening von mikroskopischen Präparaten erheblich vereinfacht und im klinischen Maßstab erst möglich wird.

Es wurde gefunden, daß eine besonders gute Trennleistung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte im Bereich von 1,060-1,067 g/ml, bevorzugter von 1,060-1,065 g/ml und besonders bevorzugt von etwa 1,065 g/ml erzielt wird.

Die Zentrifugation wird vorteilhaft bei ca. 1.000 x g über ca. 30 Minuten durchgeführt. Die Temperatur während der Zentrifugation beträgt vorzugsweise ca. 4°C. Insbesondere hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Zentrifugation mit langsamer Beschleunigung und ohne Bremsen durchgeführt wird, damit das Zellseparationsmedium und die Körperflüssigkeit zu Beginn der Zentrifugation bzw. die Fraktionen am Ende der Zentrifugation nicht miteinander vermischt werden.

Als Zellseparationsmedium läßt sich im Prinzip jede geeignete Flüssigkeit gewünschter Dichte verwenden. Das Zellseparationsmedium sollte nicht mit der Körperflüssigkeit oder den darin enthaltenen Zellen reagieren. Vorteilhaft kann beispielsweise Ficoll oder Percoll verwendet werden, wobei die Lösungen jeweils nach Anweisungen des Herstellers auf die gewünschte Dichte gebracht werden. Beispielsweise berechnet sich die Menge der zu verdünnenden Percoll-Stammlösung mit einer Dichte von 1,13 g/ml, die zur Herstellung von 100 ml einer Percoll-Arbeitslösung gewünschter Dichte (dd) benötigt wird, nach der Formel:

10% der Percoll-Arbeitslösung gewünschter Dichte bestehen immer aus einer 1,5 M NaCl-Lösung, um eine physiologische Osmolarität zu gewährleisten. Die Differenz zwischen der nach der vorstehenden Formel berechneten Menge an Percoll-Stammlösung (Dichte 1,13 g/ml) und der Salzlösung zu 100 ml wird dann mit Wasser aufgefüllt.

22

Damit läßt sich eine Percoll-Arbeitslösung mit einer Dichte von 1,060~g/ml beispielsweise wie folgt herstellen:

41,54 ml der Percoll-Stammlösung (Dichte von 1,13 g/ml)

48,46 ml H<sub>2</sub>O

10,00 ml 1,5 M NaCl

100,00 ml Percoll-Arbeitslösung, dd 1,060 g/ml

Die angegebenen Dichten beziehen sich auf eine Temperatur von 20°C. Vorteilhaft werden die Arbeitslösungen bei Raumtemperatur hergestellt und beispielsweise mit Hilfe von Marker-Beads einer definierten Dichte überprüft.

Wenn peripheres Blut als Körperflüssigkeit eingesetzt wird, wird dieses vorteilhaft in einer gerinnungshemmenden Substanz Überschichten dem vor und abgenommen Zellseparationsmediums mit einem Verdünnungsmittel verdünnt. Als gerinnungshemmende Substanzen werden bevorzugt EDTA oder Verdünnungsmedium eignet eingesetzt, als beispielsweise PBS. Das Blut wird vorzugsweise im Verhältnis von ca. 1:1 verdünnt. Als peripheres Blut eignet sich venöses oder arterielles Blut.

wird für Körperflüssigkeit untersuchende zu Die entsprechend Tumorzellen der Standardprotokolle entnommen bzw. gesammelt. In Abhängigkeit von der Art der Körperflüssigkeit wird diese dann entweder zunächst mit einem Verdünnungsmittel, bevorzugt einem Puffer, verdünnt oder direkt unverdünnt in einem Zentrifugationsgefäß über das Zellseparationsmedium geschichtet. Alternativ kann die Körperflüssigkeit zuvor bei beispielsweise 1.000 x g für ca. 10 Min. zentrifugiert und nach Resuspension der Zellen in Zellseparationsmedium geschichtet das Puffer über einem werden. Der bevorzugt verwendete Puffer ist Dulbecco PBS. Als

23

Zentrifugationsgefäß eignet sich insbesondere ein silikonisiertes Zentrifugationsgefäß bevorzugt aus Kunststoff mit einer Kapazität von beispielsweise 1-500 ml. Das Zentrifugationsgefäß sollte verschließbar sein.

Ausführungsform des bevorzugten weiteren einer In Anreicherungsverfahrens werden der Körperflüssigkeit vor dem Überschichten eine oder mehrere Substanzen zugegeben, eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen verhindern. Beispiel können zum Substanzen Verdünnungsmittel verwendeten Puffer zugesetzt werden. Als Aggregation von unerwünschte eine Substanzen, die eignen sich verhindern, Tumorzellen an Thrombozyten citrate (acid ACD-A und EDTA, Citrat beispielsweise die kann dessen statt oder Zusätzlich dextrose). Substanzen Überschichten von dem Körperflüssiqkeit vor befreit werden, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen fördern. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Ionen wie Magnesium- und Calciumionen.

Im Zentrifugationsgefäß wird das Zellseparationsmedium, das eine höhere Dichte als die zu untersuchende Körperflüssigkeit der mit anschließend und vorgelegt, aufweist, Größe des nach überschichtet. Je Körperflüssigkeit Zentrifugationsgefäßes und dem Volumen der Körperflüssigkeit, aus der die Tumorzellen angereichert werden sollen, kann das Zellseparationsmedium beispielsweise mit einem Volumen von 1-250 ml vorgelegt werden.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes nach der Zentrifugation und vor der Abnahme der an Tumorzellen angereicherten Interphase kurzzeitig stark abgekühlt wird um Zell-Kontaminationen zu verhindern. Beispielsweise können die im Zellpellet befindlichen Erythrozyten und Leucozyten dadurch immobilisiert werden, daß das untere Viertel des

. . . . . .

24

flüssigem in Minuten 5-10 für Zentrifugationsgefäßes Interphase abgekühlt wird. Als Stickstoff stark vorliegend der Übergang zwischen dem Zellseparationsmedium und der darüberliegenden Körperflüssigkeit bezeichnet. In dieser Interphase reichern sich die Tumorzellen an und werden nach der Zentrifugation beispielsweise durch Absaugen dieser Abkühlen starke das gesammelt. Durch Zentrifugationsgefäßes wird ein Vermischen der Zellen aus den verschiedenen Phasen verhindert, wodurch falsch-positive Testergebnisse ausgeschlossen werden können.

Um einen möglichst einfachen Ablauf der Arbeiten zu sichern, kann die Zentrifugation in einem Gefäß durchgeführt werden, das durch eine poröse Barriere, einen Filter oder ein Sieb, nachfolgend poröse Barriere oder Barriere genannt, in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt ist, wobei das Zellsuspensionsmedium im unteren Kompartiment vorgelegt und die Körperflüssigkeit in das obere Kompartiment eingebracht wird. Hierdurch wird ein Vermischen der zu untersuchenden Körperflüssigkeit im oberen Kompartiment mit dem Zellseparationsmedium im unteren Kompartiment vor und nach dem Zentrifugationsschritt vermieden.

Die Position der porösen Barriere in dem Zentrifugationsgefäß kann dabei so gewählt werden, daß der Flüssigkeitsspiegel des Zellseparationsmediums entweder genau unterhalb, genau innerhalb oder genau oberhalb der porösen Barriere zu liegen kommt.

Die poröse Barriere kann beispielsweise eine Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 5 mm aufweisen. Die poröse Barriere sollte darüber hinaus eine Festigkeit aufweisen, die es ihr erlaubt den Zentrifugationskräften unbeschadet Stand zu halten.

PCT/EP99/00716 WO 99/40221

Eine bevorzugte Verwendung finden Barrieren mit einer porösen Beschaffenheit, die es erlaubt, daß bei der Zentrifugation Flüssigkeit sowie die korpuskulären Bestandteile des Blutes, wie die Zellen des roten und weißen Blutsystems, nicht aber die Tumorzellen die poröse Barriere ungehindert passieren können. Dies hat zur Folge, daß das Zellseparationsmedium während der Zentrifugation durch die poröse Membran in das obere Kompartiment gedrängt wird und die Tumorzellen und Thrombozyten auf einer Ebene oberhalb der Barriere zu liegen kommen. Hierzu eignen sich insbesondere poröse Barrieren mit einer Porengröße von 20-100  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 20-30  $\mu\text{m}$ .

jedem geeigneten Material poröse Barriere kann aus bestehen. Beispielsweise eignen sich Kunststoff, Metall, Keramik oder eine Mischung oder spezielle Legierung dieser Stoffe. Es kann aber auch jedes andere natürliche oder künstliche, geeignete Material eingesetzt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform besteht die poröse Barriere aus einem hydrophoben Material oder ist mit einem hydrophoben Material beschichtet.

Mit Hilfe der porösen Barriere kann die zu untersuchende Körperflüssigkeit in das Zentrifugationsgefäß gefüllt werden, darunterliegenden dem mit sich sie daß ohne Zellseparationsmedium vermischt und somit die Anreicherung beeinträchtigen oder unmöglich machen kann.

der die befinden sich Zentrifugation der Nach Körperflüssigkeit vorhandenen Tumorzellen in der Interphase des oberen Kompartiments des Zentrifugationsgefäßes. Flüssigkeit oberhalb der Interphase kann dann zu etwa 80% dieser abgesaugt und verworfen werden. Bei handelt es sich beispielsweise Restflüssigkeit Verwendung von Blut als Körperflüssigkeit um ein Plasma/PBS-Gemisch, das die Serumproteine enthält.

26

Der verbleibende Überstand oberhalb der Barriere, in dem sich die Tumorzellen befinden, kann anschließend gesammelt und Zentrifugationsgefäß frisches in ein beispielsweise (vorzugsweise aus silikonisiertem Kunststoff und mit der verwendete Volumenkapazität wie das Zentrifugationsgefäß) überführt werden. Die poröse Barriere verhindert bei der Entnahme des verbleibenden Überstands ein unteren und des oberen des der Zellen Vermischen Kompartiments.

Vorteilhaft wird anschließend das obere Kompartiment des Zentrifugationsgefäßes beispielsweise mit zweimal Puffer nachgewaschen und dieser wird ebenfalls in das frische Puffer eignen Als Zentrifugationsgefäß überführt. beispielsweise Dulbeccos PBS (3,9 mM EDTA, pH 8,0 ohne Calcium und Magnesium) oder NaCl/10% ACD-A (Guidlines for the collection, processing and storage of human bone marrow and peripheral stem cells for transplantation, prepared by the BCSH Blood Transufsion Task. Transfus. Med. 1994; 4: 165-72) einer ACD-A/1% Albumin). Nach Zentrifugation beispielsweise bei 1.000 x g über ca. 10 Min. bei einer Temperatur von ca. 4°C können die gesammelten Zellen beispielsweise den Tumorzellnachweismethoden zugeführt werden.

Um den nach der Zentrifugation die Tumorzellen enthaltenden Zellring an der Interphase zwischen Zellseparationsmedium und Körperflüssigkeit für die Entnahme aus dem Zentrifugationsgefäß besser sichtbar zu machen, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, dem Zellseparationsmedium einen Farbstoff zuzugeben. Beispielsweise können zu 100 ml einer Percoll-Arbeitslösung 80  $\mu$ l einer 5% Trypan Blau-Lösung zugegeben werden.

PCT/EP99/00716 WO 99/40221

27

Bei Verwendung eines Zentrifugationsgefäßes mit poröser Barriere wird nach Entnahme der überstehenden Restflüssigkeit oberhalb der Interphase jedoch bevorzugt nicht nur die gesamte verbliebene Flüssigkeit Interphase sondern die oberhalb der porösen Barriere entnommen, nicht weil sich zwischen Interphase und poröser Barriere noch weitere Zellen befinden, sondern weil durch die Abnahme die im Zellring enthaltenen Zellen leicht durchmischt werden können. Um keine Zellen aus dem oberen Kompartiment zu verlieren wird dieses vorteilhaft noch zweimal mit Puffer (z.B. PBS) gewaschen.

Mit dem Anreicherungsschritt können zirkulierende Tumorzellen zirkulierende Tumorzellen von insbesondere Tumoren, d.h. von nicht-hämatologischen Tumoren, angereichert werden oder hämatologische Tumorzellen, d.h. Tumorzellen des roten und weißen Blutsystems.

Mit dem Anreicherungsverfahren können Tumorzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte nahezu vollständig von den korpuskulären Bestandteilen von Körperflüssigkeiten wie z.B. Blutsystems getrennt, roten und weißen Zellen des nächsten Schritt des anschließend dem konzentriert und zugeführt Quantifizierungsverfahrens erfindungsgemäßen werden.

Das beschriebene Anreicherungsverfahren bietet den Vorteil, daß Telomerase-positive hämatopoetische Zellen einfach und sicher von den anzureichernden Tumorzellen abgetrennt werden, anschließenden Quantifizierungsschritt daß im falsch-positiven Ergebnisse durch Telomerase-aktive nicht-Tumorzellen erhalten werden. Darüber hinaus sind nur wenige Arbeitsschritte für die Anreicherung und Isolierung der Tumorzellen aus Körpergewebe notwendig, so daß dadurch die Prozessierung von größeren Mengen von Probenmaterial möglich Die Kosten für die notwendigen Materialien spezifischer Verwendung der beispielsweise gegenüber

28

Antikörper und der anschließenden Trennung mittels geeigneter Apparaturen signifikant geringer.

10 Untersuchung von die zeigte hinaus Darüber Tumorgeweben, wie Zellinien, die von unterschiedlichen Leberund Lungen-, Brust-, Prostata-, Melanom, Colorektalkarzinomen abgeleitet waren, daß die Zellen all dieser Zellinien in ihrer Mehrzahl durch das beschriebene Anreicherungsverfahren angereichert wurden.

In einer alternativen Vorgehensweise zur Auftrennung der Blutzellen in Ficoll oder Percoll können die in der Probe enthaltenen Zellen, unter Konditionen kultiviert werden, die für kontaminierende Telomerase-positive Nicht-Tumorzellen ungünstig, jedoch für die vorhandenen Tumorzellen günstig sind. Das Resultat dieser Kultivierungsverfahren ist, daß kontaminierende Telomerase-positive Nicht-Tumorzellen absterben während vorhandene Tumorzellen überleben.

Hierfür kann zur Optimierung der Zellkultur, um die Proliferation der Tumorzellen einerseits und den Eintritt der Blutzellen in die  $G_0/G_1$ -Phase bzw. deren Apoptose anderseits zu favorisieren, um vorhandene metastasierende Tumorzellen anzureichern, die Probe folgenden Bedingungen ausgesetzt werden:

Auswahl geeigneter Kulturmedien unter Verwendung (autologer) Seren,

Dauer der Kultivierung,

Auswahl des optimalen Sauerstoff-/Kohlendioxidgehalts,

Zugabe von Tumor-Zell-/Epithelzell-spezifischen Wachstumsfaktoren (Bsp. EGF etc.) oder

Auswahl einer geeigneten Oberflächen-Beschichtung, um die Adhärenz der Tumorzellen in Zellkulturbehältern zu erhöhen

29

und Selektion von adhärenten Zellen gegenüber Suspensionszellen.

Die Kultivierung kann somit beispielsweise wie folgt ausgeführt werden:

Die in der Probe enthaltenen Zellen können gesamt oder in Aliquoten (z.B. auf Mikrotiterplatten) mit oder ohne Zusätze in Kultur genommen werden. Diese Kulturen können in Folge Nicht-Tumorzellen werden, die ausgesetzt Einílüssen absterben, jedoch Tumorzellen überleben lassen. Die Einflüsse schon allein beispielsweise Kultivierung, interne (z.B. Anstieg oder Abnahme des pH-Wertes im Kulturmedium) oder externe Einflüsse (wie z.B. Erhöhung oder Erniedrigung von  $pCO_2$  oder  $pO_2$ ) sein. Unsere Untersuchungen haben z.B. gezeigt, daß schon bei einer einfachen Kultivierung von Vollblut bei 37°C für 5 Tage, die mRNA kodierend für die der katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase (hTRT) zwischen Tag 1 und Tag 2 nicht mehr nachweisbar war. Noch nachzuweisen waren hingegen die mRNA für den T-Zell-Rezeptor (TCR) (3 Tage) und ß-Aktin (5 Tage) (vgl. Abb. 4).

Die Kultivierung der in den Flüssigkeiten enthaltenen Nicht-Tumorzellen und Tumorzellen nach den oben genannten Verfahren kann auch zusätzlich sowohl vor als auch nach Separation der Zellen aus der Körperflüssigkeit (z.B. nach Gradientenzentrifugation z.B. mit Fiquoll-Hypaque) erfolgen.

Allein oder in Verbindung mit den oben beschriebenen Reinigungs- bzw. Kultivierungsverfahren ist es auch besonders vorteilhaft die Menge an für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierender mRNA aus venösem Blut mit der Menge an für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierender mRNA aus arteriellem Blut zu vergleichen, da bei

30

venöser Blutabnahme zum Zwecke der Tumorzellbestimmung etwa nur 20% aller Zellen gegenüber 100% der Zellen bei arterieller Blutabnahme nachweisbar sind [Koop, S. et al. (1995) Cancer Res. 55, 2520-2523]. Ebenso eignet sich ein Vergleich von Blut aus der Fingerkuppe mit venösem oder arteriellem Blut.

die katalytische quantitative Bestimmung für der Die Untereinheit der Telomerase kodierenden mRNA in der Probe ermöglicht es, zu bestimmen, ob Tumorzellen, insbesondere Metastasen, vor allem Mikrometastasen, von malignen Tumoren in der Körperflüssigkeit enthalten sind und in welcher Menge. Dies ist insbesondere für die frühzeitige klinische Diagnose der Metastasenbildung von malignen Tumoren und für die Überwachung einer Tumortherapie von großem Nutzen. Als Erfindung vorliegenden der mit Tumorzellen können vorzugsweise Metastasen, Tumorzellen von insbesondere vor allem Zellen Tumoren, von malignen Mikrometastasen, Tumore und/oder Neoplasien nachgewiesen metastasierender werden, die beispielsweise von einem T-Zell-Lymphoblastom, Tchronisch myeloische Leukämiezellen, Zell-Leukämiezellen, lymphatische akute lymphatische Leukämiezellen, chronisch Lungenkarzinom, Melanom, Teratokarzinom, Leukämiezellen, Dickdarmkrebs, Brustkrebs, Leberzellkarzinom, Nierentumor, Neuroblastom, Prostatakarzinom, Nebennierentumor, Lungenzellkarzinom, Rhabdomyosarkom, Gehirntumor, kleines Leiomyosarkom und/oder Lymphom abstammen.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind die Oligonukleotid-Primer mit der Sequenz

<sup>5&#</sup>x27; CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder

<sup>5&#</sup>x27; GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTTCTG 3' (hTRT2),

PCT/EP99/00716 WO 99/40221

31

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können;

sowie ein Oligonukleotid mit der Sequenz

5' CGTTCTGGCT CCCACGACGT AGTC 3' (hTRT 0)

entsprechende Oligonukleotid-Sonde die und als komplementäre Sequenz des Oligonukleotids zum Nachweis der amplifizierten "antisense" RNA.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, beispielsweise Blut, Urin aber auch Stuhl, Exsudate oder Transudate von Körperhöhlen, insbesondere peripheres Blut, enthaltend

- spezifischen Oligonukleotid-Primerpaar zur ein (a) Amplifizierung von Telomerase-kodierender Nukleinsäure, wobei das Oligonukleotid-Primerpaar vorzugsweise folgende Sequenzen aufweist:
- 5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder
- 5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTTCTG 3' (hTRT2),

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können.

weiteren einer in umfaßt erfindungsgemäße Kit Nukleinsäure eine zusätzlich (b) Ausführungsform Nukleinsäuren zur Co-Amplifikation, wobei vorzugsweise 3 RNA-Standard-Nukleinsäuren zur Co-Amplifikation enthalten sind.

Der erfindungsgemäße Kit kann auch zusätzlich, wie oben näher Oligonukleotid als markiertes ein beschrieben, Nachweis der spezifischen zum Hybridisierungsprobe Wildtypsequenz und/oder mehrere amplifizierten cDNA der

32

Hybridisierungsprobe als Oligonukleotide markierte spezifischen Nachweis der amplifizierten cDNA der Standard-Nukleinsäure bzw. -Nukleinsäuren enthalten. Darüber hinaus kann ein erfindungsgemäßer Kit für die PCR-Amplifikation beschriebenen Enzyme, näher zusätzlich die oben gegebenenfalls markierte Nukleotide und/oder geeignete Puffer enthalten, wie z. B. eine reverse Transkriptase, vorzugsweise DNA-Polymerase, Transkriptase, eine reverse vorzugsweise eine Taq-Polymerase und/oder eine DNase und gegebenenfalls zur Abreicherung von Stammzellen und/oder Anreicherung und/oder zur Immunzellen aktivierten bereits näher Mittel, wie oben Tumorzellen geeignete beschrieben.

Ein anderer erfindungsgemäßer Kit für die NASBA-Amplifikation kann ebenso neben den oben näher beschriebenen Standard-Oligonukleotid markiertes Nukleinsäuren ein der spezifischen zum Hybridisierungsprobe amplifizierten "antisense" RNA der Wildtypsequenz und/oder mehrere markierte Oligonukleotide als Hybridisierungsprobe zum spezifischen Nachweis der amplifizierten "antisense" RNA enthalten. -Nukleinsäuren Standard-Nukleinsäure bzw. Zusätzlich kann er ebenso die oben näher beschriebenen und/oder Nukleotide gegebenenfalls markierte Enzyme, geeignete Puffer, wie z. B. eine reverse Transkriptase, eine RNAvorzugsweise eine AMV reverse Transkriptase, Polymerase, vorzugsweise eine T7 RNA-Polymerase, eine RNase H gegebenenfalls DNase enthalten, und eine Abreicherung von Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel, wie oben bereits näher beschrieben.

Die folgenden Beispiele und Figuren sollen die vorliegende Erfindung näher beschreiben, ohne sie jedoch darauf zu beschränken.

PCT/EP99/00716

## Beschreibung der Figuren

Abb. 1 zeigt die von Nakamura et al. beschriebene Sequenz, kodierend für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase, von 4015 Basenpaaren (bp) und die Position der entworfenen Oligonukleotid-Primer bzw. die Oligonukleotid-Sonde (hTRT o) (unterstrichen): 5'-Primer hTRT1 (Position 1780-1813), 3'-Primer hTRT2 (Position 2261-2290) mit einem Amplifikationsprodukt von 513 Basenpaaren (bp) und die Sonde hTRT o (Position 1964-1987).

Darstellung schematische eine (A) zeiqt Abb. genomischen Organisation der menschlichen Telomerase (hTRT). Telomerase-Protein weist eine Telomerase-spezifische Region auf (T, schwarz markiert) und besitzt Homologien zu Transkriptasen Reversen Regionen von konservierten verschiedener Viren (1, 2 und A bis E, schraffiert) La Das verwendete Primerpaar (hTRT1, hTRT2) ist dargestellt und ist in einer Region lokalisiert, die keine Homologien mit viralen Reversen Transkriptasen aufweist. (B) RT-PCReiner Agarose-Gelelektrophorese eine Amplifikation mit hTRT-spezifischen Primern RNA an humanen Teratokarzinom-Zellinie Tera2. Bande M: Marker, Bande 1 RT-PCR-Amplifikation, Bande 2: entsprechende DNA-Kontrolle ohne Reverse Transkriptase Reaktion.

Abb. 3 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese (a) der RT-PCR-Produkte mit TCR-spezifischen Primern an RNA und DNA von humanen PBMC und der humanen Fibroblasten-Zellinie MRC5 und die entsprechende Southern-Blot-Analyse mit einer TCR-spezifischen Oligonukleotid-Sonde (TCR-Sonde). M: Marker.

Abb. 4 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte mit spezifischen Primern für hTRT (A) bzw. TCR und Aktin (B) an aus 1 ml Vollblut isolierter RNA, nach 0-5 Tagen

34

Kultur sowie eine Reaktion an der RNA der humanen Teratokarzinom-Zellinie Tera2. Banden  $0^d-5^d$ : Zeitraum der Kultur von respektive 0 bis 5 Tagen. M: Marker, Tera2: humane Teratokarzinom-Zellinie Tera2.

Abb. 5 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte an RNA der Prostata-Karzinom Zellinie LNcap. Banden  $10^3$ - $10^{-2}$ : Verwendete Zellzahl pro Ansatz. DNA: DNA Kontrolle.  $H_20$ : Wasser Kontrolle. M: Marker. Die PCR wurde, wie in Abb. 7 angegeben mit spezifischen Primern (Abb. 6) für die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase (A) und  $\beta$ -Aktin, mit 40 Zyklen durchgeführt. Unter den beschriebenen RT-PCR-Bedingungen ist die für die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase kodierende mRNA in bis zu 10 Zellen nachweisbar (Pfeil). Zum Ausschluß von DNA-Kontaminationen wurde RNA von  $10^3$  Zellen ohne Reverse Transkriptase als Kontrollreaktion sowie eine Wasser-Kontrolle ( $H_20$ ) in der RT-PCR mitgeführt.

Abb. 6 zeigt die Sequenzen der vorliegend eingesetzten Oligonukleotide.

Abb. 7 zeigt ein Flußdiagramm für das erfindungsgemäße Verfahren.

Abb. 8 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von Blut eines gesunden Spenders (A) und Blut des gleichen Spenders gemischt mit GFP-transfizierten Zellen der Melanom-Zellinie T289 (B, C) nach Tumorzellenanreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,070 g/ml.

Abb. 9 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von Blut gesunder Spender, das mit Tumorzellen einer Prostata-Karzinom- (A) und Mamma-Karzinom-Zellinie (B) gemischt wurde, nach Tumorzellanreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,065 g/ml.

35

Abb. 10 zeigt die Wiederfindungsrate von GFP-transfizierten Melanomzellen, die zu Blut unterschiedlicher (A, B) gesunder Spender gemischt wurden, nach Anreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,065 g/ml.

#### **BEISPIELE**

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die folgenden Beispiele nach Standardverfahren, wie z.B. bei Sambrook, J. et al. (1989) supra beschrieben, oder nach den Herstellerangaben der verwendeten Kits bzw. Enzyme durchgeführt.

# 1. Tumorzellanreicherung

## 1.1 Allgemeines Vorgehen

einem silikonisierten Kunststoff-Zentrifugationsgefäß wurde venöses Blut (5-20 ml), mit EDTA versetz (3,9 mM Endkonzentration, pH 8,0) und mit 1 Volumen PBS gemischt. Das Blut/PBS-Gemisch wurde anschließend auf 5-10 ml Percoll mit einer Dichte von 1,065 g/ml gegeben und bei langsamer Beschleunigung und ohne Bremse für 30 min. bei 1.000 x g und Viertel Das untere zentrifugiert. 4°C Zentrifugationsgefäßes wurde anschließend für 5-10 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Dadurch wurde während des Absaugens der Zellen, die sich an der Interphase im Übergang zwischen dem Percoll und dem darüberliegenden Plasma/PBS-Gemisch befanden, eine Kontamination mit Zellen des Pellets verhindert. Die Zellen der Interphase, bei denen es sich vorwiegend um Thrombozyten und um im Blut zirkulierende Tumorzellen handelte, wurden anschließend in ein neues übertragen Kunststoff-Zentrifugationsgefäß silikonisiertes und für 10 min bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Für die anschließende RT-PCR-Untersuchung wurde das Zellpellet in einem Guanidium-Isothiocyanat-Puffer aufgenommen, wodurch die

36

Zellen lysiert wurden und einer RNA-Isolierung unterzogen werden konnten.

#### 1.2 Spiking-Experiment

Mit Hilfe von sogenannten Spiking-Experimenten, bei denen Tumorzellen verschiedener Zellinien zum Blut normaler Spender gemischt wurden und die Tumorzellen anschließend re-isoliert und in der RT-PCR untersucht wurden, wurde gezeigt, daß in die verwendeten Zellinie der Abhängigkeit Tumorzellen/ml gespikter 1 - 4Aktivität von etwa nachgewiesen werden kann.

Hierzu wurden die Zellen der zu spikenden Tumorzellinien entsprechend der Angaben des Herstellers (ATCC, American Tissue Cell Culture) bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden anschließend trypsiniert und in Medium (RPMI 1640) gewaschen. Nach Entnahme eines 10  $\mu$ l Aliquots, das 1:1 mit Tryptan-Blau gemischt wurde, wurden die lebenden Zellen in entsprechende und die bestimmt 2ählkammer einer Zellkonzentration wurde berechnet. Anschließend wurde die Zellsuspension verdünnt und ein Volumen, das einer bestimmten Blut gesunder Blutspender Zellzahl entspricht, mit dem gemischt. Als Kontrolle diente Blut dem keine Tumorzellen zugesetzt wurden. Die Anreicherung der gespikten Tumorzellen wurde einmal zum Vergleich mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,070 g/ml und nach dem erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden anschließend mikroskopische, durchflußzytometrische und RT-PCR-Analysen durchgeführt.

## a) Vergleichsversuch

Abb. 8 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von 20 ml Blut eines gesunden Spenders (A) und 20 ml Blut des gleichen Spenders gemischt mit GFP-transfizierten Zellen der Melanom-

Zellinie T289 (B, C). Das Blut wurde auf Percoll einer Dichte von 1,070 g/ml geschichtet, zentrifugiert und anschließend wurden die Zellen analysiert. Die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTRT) ist im normalen Blut nicht nachweisbar (A), während bei 1 und 2 gespikten Melanomzellen pro ml Blut hTRT nachweisbar ist (B, C). Bei der verwendeten Percoll-Dichte von 1,070 g/ml sind jedoch noch hinreichend viele Telomerase-aktive Leukozyten in der Interphase vorhanden, wodurch die RNA-Komponente (hTR) auch im ungespikten Blut aktivierten Für die Präsenz von nachweisbar ist. wahrscheinlich deshalb auch Telomerase-aktiven Leukozyten in der Fraktion der isolierten Zellen spricht auch die Tatsache, daß CD69, ein früher Aktivierungsmarker in B- und T-Zellen, in allen Blutproben nachweisbar ist (A-C). Der Tumormarker CEA (Carcinoembrionic Antigene) ist sowohl im ungespikten als auch im gespikten Blut negativ (A-C). GFP (Green Fluorescent Protein), der als zusätzlicher Marker für die gespikten Tumorzellen verwendet wurde, ist im ungespikten Blut nicht nachweisbar (A). Da nur etwa 50% der transfizierten T289-Melanomzellen GFP exprimieren, ist das Protein nur in bis zu 2 gespikten Tumorzellen pro ml Blut nachweisbar (B). Aktin diente als RT-PCR-Positivkontrolle (Aktin) und im Ansatz ohne RT-Reaktion als Negativkontrolle (Aktin  $\oslash$ RT). Die Amplifikation genomischer DNA untransfizierter T289-Zellen führt mit den spezifischen Primerpaaren für hTRT, GFP und CD69 zu keinen Amplifikaten.

# b) erfindungsgemäßer Versuch

Abb. 9 zeigt RT-PCR-Analysen von Blut gesunder Spender das mit Tumorzellen einer Prostata-Karzinom- (A) und Mamma-Karzinom-Zellinie (B) gemischt, auf Percoll einer Dichte von anschließend geschichtet, zentrifugiert und analysiert wurde. Die RNA-Komponente der Telomerase (hTR) ist im Unterschied zu der Verwendung von Percoll mit einer Dichte

von 1,070 g/ml im ungespikten Blut nicht nachweisbar (vgl. Prostatagespikten Proben mit 2 den 1). In Karzinomzellen (A) bzw. mit 4 gespikten Mamma-Karzinomzellen (B) pro ml Blut kann hTR nachgewiesen werden (schwarzer Pfeil). Im Unterschied zur Melanom-Zellinie T289 konnte bei diesen Tumorzellen keine (A) bzw. erst bei  $10^4$  Tumorzellen (B) eine Expression der katalytischen Untereinheit (hTRT) Prostatazell-spezifische Weder der nachgewiesen werden. Marker PSA (Prostate Specific Antigene) noch der Epithelzellist (Cytokeratin 20) CK20 spezifische Marker entsprechenden Tumorzellen nachweisbar. Aktin dient als RT-PCR-Positivkontrolle.

Abb. 10 zeigt die Wiederfindungsraten von GFP-transfizierten Melanomzellen (T289), die zu Blutproben gesunder Spender gemischt (gespikt) wurden. Die gespikten Blutproben wurden Dichte von auf Percoll einer anschließend geschichtet, zentrifugiert und die Anzahl der re-isolierten mikroskopisch wurde (Wiederfindung) Tumorzellen und/oder durchflußzytometrisch (-▲-) bestimmt. Da nur etwa 75% für Probe A bzw. 50% für Probe B der GFP-transfizierten T289-Zellen im Durchflußzytometer nachweisbar waren, wurden korrigiert. entsprechend Wiederfindungsraten Wiederfindungsrate gespikter Tumorzellen ist abhängig vom jeweiligen Blutspender (die Blutproben von A) und B) stammen von unterschiedlichen Spendern), der verwendeten Zellinie und verhält sich umgekehrt proportional zur Anzahl der gespikten Tumorzellen. Möglicherweise führt eine Abstoßungs-Reaktion entsprechenden hämatopoetischen Zellen gespikten der Verlust schließlich zum und Aggregation allogenen Tumorzellen. B) zeigt darüber hinaus, Anzahl der tatsächlich gespikten Tumorzellen (- - zwischen 6% - 37% geringer ist als die theoretisch berechnete Anzahl gespikter Tumorzellen (-igspace -).

39

Unter Hinzunahme hier nicht dargestellter Untersuchungen mit sich eine ergibt Mamma-Karzinc pzellen und durchschnittliche Wiederfindungsrate mit der erfindungsgemäß bevorzugten Anreicherungsmethode von 46%  $\pm$  20% für 4-512 gespikte Zellen (n=16) und für  $\leq$  50 gespikte Zellen von 54%  $\pm$ 20% (n=15).

erfindungsgemäß die Wiederfindungsrate des liegt Damit Tumorzellenanreicherungsverfahrens im bevorzugten Bereich von magnetischen Zell-Separatoren wie MACS für die eine Wiederfindungsrate von etwa 30-58% angegeben wird.

Kultivierung und Isolierung von peripherem Blut, Gewebe 2. und Zellen für die nachfolgenden Beispiele

Tumorzellinien wie die menschliche Prostata-Karzinom-Zellinie LNcap und die Teratokarzinom Zell-Linie Tera 2 wurden gemäß den Vorgaben der ATCC (American Tissue Culture Collection), Spenderblut von Venöses Kultur genommen. Kontrollpersonen wurde mittels Punktion einer Unterarmvene in  ${\tt EDTA-Monovetten}^{\circledR}$  (Saarsted) abgenommen.

> Isolierung von zellulärer RNA 3.

Die Isolierung von totaler zellulärer RNA erfolgte nach Standardverfahren [Chomczynski et al. (1987) Anal Biochem 162, 156; Sambrook, J. et al. (1989). Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Peripheres Blut wurde wie in Abb. 7 gezeigt sofort nach Abnahme in RNA-Lysispuffer (4 M Guanidinium Isothiocyanat; 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1% Mercaptoethanol) überführt und homogenisiert. Die Gemische wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -70°C gelagert.

40

 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde mit dem GeneAmp® RNA-PCR-Kit (Perkin Elmer) nach Vorgaben des Herstellers wie in Abb. 7 gezeigt durchgeführt. Aliquote der isolierten totalen RNA von peripherem Blut und Zellinien wurden jeweils zuvor mit 4U DNAse und 40U RNAse Inhibitor (Boehringer, Mannheim) in 36 µl Ansätzen (in 100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTP-Mix und 2,5 mM Random Hexamers) bei 37°C für 30 Minuten und bei 75°C für 10 Minuten hydrolysiert und anschließend die DNAse für 10 Minuten bei 90°C inaktiviert und dann das Reaktionsgemisch sofort auf Eis gegeben.

Die beiden Oligonukleotid-Primer:

- 5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und
- 5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTTCTG 3' (hTRT2)

wurden nach der von Nakamura et al. veröffentlichten Sequenz, kodierend für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase (Nakamura et al. (1997). Science 277: 955-9) entworfen (Abb. 1) und mit einem Applied Biosystem 380A Synthesizer synthetisiert. Die Spezifizität der hTRT1- und qestützter Computer mittels wurde hTRT2-Primer Nukleinsäuresequenzen den Homologieanalyse an GenBank-, EMBL-, DDBJ- und PDB-Datenbanken mittels BLASTN 1.4.9 MP [Altschul, S. F. et al. (1990). J Mol Biol 215: 403-410] überprüft.

Zur Abstimmung der Amplifikationsmengen wurden für jedes Experiment gleiche RNA-Mengen für die RT-Reaktion eingesetzt. Um eine Kontamination der RNA Präparationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde jede mit DNase hydrolysierte RNA-haltige Probe zuerst der unten beschriebenen PCR unterzogen

41

und auf Amplifikation hin überprüft. Die RNA-haltige Probe, bei der kein Amplifikationsprodukt nachweisbar war, wurde für die folgenden cDNA-Synthese- und PCR-Schritte eingesetzt. Als interne Standardkontrolle wurden Oligonukleotid-Primer für  $\beta$ -Die 6). eingesetzt (Abb. Aktin und den TCR Transkriptase-Reaktion wurde an 18 µl des DNAse Verdaues unter Zugabe von 50U MuLV Reverser Transkriptase und 40U RNase Inhibitor bei 42°C für 30 Minuten durchgeführt und die für 5 Minuten abgebrochen. Reaktion bei 99°C Negativkontrollen wurden statt der Enzyme 4 µl Wasser zugesetzt.

Die PCR wurde wie in Abb. 7 gezeigt an 5 µl der cDNA-Reaktion nach folgendem Programm durchgeführt: (97°C: 15 Sekunden vorwärmen); (97°C: 15 Sekunden, 70°C: 30 Sekunden [minus 0.5°C pro Zyklus], 72°C: 30 Sekunden) 10 Zyklen; (94°C: 15 Sekunden, 65°C: 30 Sekunden [minus 0.5°C pro Zyklus], 72°C: 30 Sekunden) 20 Zyklen; (94°C: 15 Sekunden, 50°C: 30 Sekunden 72°C: 30 Sekunden [plus 15 Sekunden Extension pro Zyklus], 10 Zyklen; (72°C: 7 Minuten, finale Extension).

Die Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch auf 1.5%igem TAE Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht visualisiert und fotodokumentiert (siehe Abb. 2-5).

5. Herstellung möglicher RNA-Standard-Nukleinsäuren (hTRTKa, hTRTKb und hTRTKc)

Die zur Klonierung bestimmten PCR-Amplifikationsprodukte können gelelektrophoretisch auf 1.5% TAE Agarose aufgetrennt und eluiert (Qiagen) werden. Die Aufreinigung der Restriktionshydrolysate kann durch Phenol-Chlorophorm-Extraktion und Fällung in Salz und Ethanol oder durch DNS-Reinigung (Qiagen) geschehen. Die Konstrukte können, z.B.

42

durch Ligierung der Fragmente in die korrespondierenden Schnittstellen eines Klonierungs- und Transkriptionsvektors, z.B. pGEM-13Zf(+), mit Hilfe der T4 Ligase geschaffen werden. Dieser Vektor erlaubt die in vitro Transkription von klonierten Fragmenten durch den wahlweisen Einsatz von Sp6oder T7 RNA Polymerasen. Kompetente Bakterien (XL-1Blue, (BioRad) Elektroporation mittels werden Stratagen) transformiert. Plasmid DNA wird mittels Plasmid Reinigungs (Qiagen) gereinigt. Positive Klone werden, sequenzspezifischen oder vektor-Verwendung von validiert. PCR Oligonukleotid-Primern, mit der Sequenzvalidierung der Konstrukte kann durch semiautomatische Sequenzanalyse erfolgen.

Das Konstrukt pGEM-hTRT wird als Ausgangskonstrukt für die Konstrukte pGEM-hTRT(Ka) pGEM-hTRT(Kb) und pGEM-hTRT(Kc) geschaffen. pGEM-hTRT(Ka), pGEM-hTRT(Kb) und pGEM-hTRT(Kc) unterscheiden sich von pGEM-hTRT und untereinander durch einen randomisierten Sequenzaustausch von ca. 20 Basen Paaren (bp). Die Konstrukte werden zur in vitro Transkription mit Sp6 RNA Polymerase der Standard-RNA: hTRT(Ka), hTRT(Kb) und hTRT(Kc), verwendet. Zur Bildung des Konstrukts pGEM-hTRT wird die cDNA der katalytischen Untereinheit der menschlichen NotI und in die z.B. (Abb. 1) Telomerase Schnittstellen von pGEM-13Zf(+) kloniert. Dies wird dadurch enthaltenen Schnittstellen diese mit erreicht, daß Oligonukleotid-Primern die aus der Sequenz hTRT (Abb. abgeleitet werden, eine RT-PCR an der bereits gewonnenen RNA aus Tumorzellen oder -linien unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt wird. Damit kann z.B. vorgegebenen Schnittstellen versehene Voll-Längen hTRT oder amplifiziert werden. kürzeres Fragment Restriktionshydrolyse mit spezifischen Restriktionsenzymen z.B. wie NotI und HindIII, wird das entstandene Fragment in die korrespondierenden Schnittstellen (z.B. Position 12 bzw.

43

38) von pGEM-13Zf(+) kloniert und das Konstrukt pGEM-hTRT geschaffen. Die Konstruktion von pGEM-hTRT(Ka) wird dadurch erreicht, daß im Konstrukt pGEM-hTRT eine ca. 20bp Sequenz mit einer ca. 20bp Kassette ausgetauscht wird. Austausch wird durch rekombinante PCR durchgeführt und ist beschriebenen eine Abwandlung der von Higuchi et al. Verfahren [Higuchi, R. (1988). Nucleic Acid Res 16: 7351-7367; Higuchi, R. (1990). M. Innis A. et al. eds. San Diego, New York, Berkley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press, Inc. 177-183]. In einem ersten Schritt werden zwei unabhängige PCR-Reaktionen an pGEM-hTRT durchgeführt: Das Amplifikat aus der 1. PCR-Reaktion ergibt das 5'-Fragment und wird mit geeigneten Restriktionsenzymen zu einem 5'-Fragment verdaut. Das Amplifikat aus der 2. PCR-Reaktion geeigneten wird mit und 3'-Fragment das ergibt Restriktionsenzymen zu einem 3'-Fragment hydrolysiert. Mit T4 Ligase werden die Schnittstellen der 5'- und 3'-Fragmente verbunden, in die Fragment einem zu miteinander korrespondierenden Schnittstellen von pGEM-132f(+) kloniert und das Konstrukt pGEM-hTRT(Ka) geschaffen. Die Konstruktion von pGEM-hTRT(Kb) und pGEM-hTRT(Kc) wird dadurch erreicht, daß die oben geschaffene ca. 20bp Sequenz im Konstrukt pGEMhTRT(Ka) jeweils mit einer randomisierten Sequenz von ca. 20bp ausgetauscht wird. In vitro RNA kann dann mit Sp6 RNA Polymerase von pGEM-hTRT(Ka), pGEM-hTRT(Kb) und pGEM-hTRT(Kc) geschaffen werden. Die spezifischen RNAs können dann mit zu o.a. ca. 20bp-Austauschsequenzen bzw. zu der Wildtypsequenz (wt) komplementären Oligonukleotiden O(Ka), O(Kb), O(Kc) und O(wt), nachgewiesen werden. Die weitere Aufbereitung der RNA, wie DNAse Verdau, Reinigung und Kalibrierung erfolgt nach Standardmethoden.

44

#### Ergebnisse

Die Untersuchungen an Tumorzellinien ergaben, daß die für die Telomerase menschlichen Untereinheit der katalytische kodierende mRNA in unterschiedlichen Mengen in Tumorzellinien bei gleicher Amplifikationsmenge der TCR-, bzw. ß-Actin-Kontrollreaktion nachweisbar war (Abb. 2, 4 und 5). durch konnte DNA mit genomischer Kontamination Zugabe von reverser Transkriptase Kontrollreaktion ohne jeweils ausgeschlossen werden.

In vergleichenden Untersuchungen, bei unterschiedlich langen Kultivierungen von Vollblut konnte eindeutig gezeigt werden, daß nach 1 - 5 Tagen Kultur des Vollblutes kein spezifisches Untereinheit katalytischen der Produkt RT-PCR menschlichen Telomerase mehr detektierbar war. Parallel dazu der Kultur die mit zunehmender Dauer spezifischer TCR- und Aktin-RNA sehr viel langsamer ab. Das daß Kultivierungsuntersuchungen dieser Resultat offensichtlich kontaminierende Telmomerase-positive Nicht-Tumorzellen schon zwischen Tag 0 und Tag 1 abgestorben sind.

Weiterhin ist unter den beschriebenen RT-PCR-Bedingungen an unterschiedlichen Mengen von Telomerase-positiven Tumorzellen, die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase in bis zu 10 Zellen nachweisbar.

Da im Unterschied zum TRAP-Assay in der erfindungsgemäß eingesetzten Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Methode hoch-aufgereinigte RNA zur Amplifikation verwendet wird, kann eine Inhibierung der Taq-Polymerase weitgehend ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte für die beschriebene RT-PCR-Methode eine Sensitivität für den Nachweis der RNA-Komponente (hTR) sowie der katalytischen Untereinheit (hTRT) der Telomerase von etwa 1 Zelle pro RT-

45

PCR-Ansatz gezeigt werden. Damit bietet die Verwendung der beschriebenen RT-PCR-Methode eine vergleichbare oder höhere Sensitivität des Nachweises von Telomerase-aktiven Tumorzellen. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß der Nachweis der hTR- und der hTRT-Expression mit der katalytischen Aktivität der Telomerase korreliert (K. Yashima et al., J. Clin. Pathol. (1997), 50, 110-7).

46

## <u>Patentansprüche</u>

 Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, dadurch gekennzeichnet, daß

- (a) die zu untersuchende Probe einem Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen unterzogen wird und an den an- oder abgereicherten Tumorzellen
- (b) eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierende mRNA spezifisch amplifiziert wird, und
- (c) die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird.
- 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Amplifizierungsreaktion mit der zu untersuchenden Probe eine reverse Transkriptionsreaktion durchgeführt wird, bei der die in der Probe enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben wird.
- dadurch 2, oder Anspruch 1 nach Verfahren 3. gekennzeichnet, daß mit der zu untersuchenden Probe vor der DNase-Reaktion eine CDNA mRNA in der Umschreibung durchgeführt wird.
- 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Probe vorzugsweise über eine Ionenaustausch-Chromatographie, insbesondere über Kieselgel gereinigt wird.
- dadurch der Ansprüche 1-4,einem nach Verfahren 5. Bestimmung der zur quantitativen gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Telomerase-kodierenden Amplifikationsprodukte bereits während der Amplifizierung Amplifikation Kinetik der die und werden, markiert

47

kontinuierlich schon während des Amplifikationsvorgangs gemessen wird.

- 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß während der Amplifikation eine für die Amplifikationsprodukte spezifische Sonde vorliegt, die ein für die pro Synthesezyklus amplifizierten Produkte proportionales, charakteristisches Signal aussendet.
- dadurch Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, 7. der Bestimmung quantitativen zur gekennzeichnet, daß eine, mindestens Nukleinsäure Telomerase-kodierenden co-amplifiziert Standard-Nukleinsäuren drei vorzugsweise werden, die in unterschiedlichen Konzentrationen zu der zu untersuchenden Probe dazugegeben werden.
- 1-7, nach einem der Ansprüche Verfahren das Amplifizierungsprodukt entweder 8. daß gekennzeichnet, direkt oder über eine Markierung vorzugsweise über eine Biotin-Markierung, eine eine Markierung, radioaktive eine Elektrochemolumineszenz-Fluoreszenz-Markierung oder Markierung quantifiziert wird.
- dadurch Ansprüche 1-7, Verfahren nach einem der daß das Amplifizierungsprodukt über eine 9. gekennzeichnet, Oligonukleotid markierten einem Hybridisierung mit nachgewiesen wird, wobei die Markierung vorzugsweise eine Biotin-Markierung, eine Markierung, radioaktive eine Elektrochemolumineszenz-Fluoreszenz-Markierung oder Markierung ist.
- 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7-9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Quantifizierung der zu bestimmenden Telomerase-kodierenden Nukleinsäure die Menge der co-

48

amplifizierten Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuren mit der Menge der Telomerase-kodierenden Nukleinsäure verglichen wird.

- 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um peripheres Blut handelt, und daß als positive Kontrolle mit der zu untersuchenden Probe eine Reaktion durchgeführt wird, bei der eine im peripheren Blut vorkommende Nukleinsäure, vorzugsweise die mRNA kodierend für ß-Globin, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, ß-Aktin oder den T-Zell-Rezeptor, spezifisch amplifiziert und nachgewiesen wird.
- 12. Verfahren nach Anspruch 1 oder nach einem der Ansprüche 3-11, dadurch gekennzeichnet, daß als negative Kontrollen vor der Amplifizierungsreaktion mit der zu untersuchenden Probe keine reverse Transkriptionsreaktion durchgeführt wird und/oder anstelle der Körperflüssigkeit Wasser eingesetzt wird.
- 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Amplifizierung folgende Oligonukleotid-Primer verwendet werden:
- 5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder
- 5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTTCTG 3' (hTRT2),

E. ----- Vio 454----4-

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthält.

- 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13, durch gekennzeichnet, daß zur Amplifizierung eine DNA-Polymerase oder eine RNA-Polymerase verwendet wird.
- 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle der Amplifizierung mit der DNA-

49

Polymerase die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und im Falle der Amplifizierung mit der RNA-Polymerase die isothermale Nukleinsäuresequenz-basierende Amplifikation (NASBA) durchgeführt wird.

- 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß aus der zu untersuchenden Blutprobe Stammzellen und/oder aktivierte Immunzellen vorzugsweise mittels Immunabsorption abgereichert werden.
- 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß aus der zu untersuchenden Blutprobe die Tumorzellen vorzugsweise mittels Immunabsorption angereichert werden.
- 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-17, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Probe enthaltenen Zellen unter Konditionen kultiviert werden, die für Telomerase-positive Nicht-Tumorzellen ungünstig, jedoch für vorhandene Tumorzellen günstig sind.
- 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Dauer der Kultivierung so bemessen ist, daß Nicht-Tumorzellen absterben und Tumorzellen überleben.
- 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-19, worin zur Anreicherung der Tumorzellen ein Zellseparationsmedium mit der Körperflüssigkeit überschichtet und zentrifugiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,055 bis < 1,070 g/ml aufweist.
- 21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,060-1,067 g/ml und bevorzugt von etwa 1,065 g/ml aufweist.

- 22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation bei ca. 1.000 x g über ca. 30 Minuten durchgeführt wird.
- 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-22, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium Percoll oder Ficoll ist.
- dadurch 20-23, der Ansprüche Verfahren nach einem dem Körperflüssigkeit der daß gekennzeichnet, Überschichten eine oder mehrere Substanzen zugegeben werden, Tumorzellen Thrombozyten an von Aggregation dem Körperflüssigkeit vor die und/oder verhindern, eine die befreit wird, Substanzen Überschichten von Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen fördern.
- 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-24, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeit peripheres Blut ist.
- 26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das periphere Blut in einer gerinnungshemmenden Substanz abgenommen und vor dem Überschichten des Zellseparationsmediums mit einem Verdünnungsmedium bevorzugt im Verhältnis von ca. 1:1 verdünnt wird.
- 27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß das periphere Blut venöses oder arterielles Blut ist.
- 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-24, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeit ausgewählt ist aus Lymphe, Urin, Exsudaten, Transudaten, Spinalflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Speichel, Flüssigkeiten aus natürlichen

oder unnatürlichen Körperhöhlen, Knochenmark und dispergiertem Körpergewebe.

- 20-28, der Ansprüche 29. Verfahren nach einem nach Zentrifugationsgefäß daß das gekennzeichnet, Tumorzellen der Abnahme der an Zentrifugation und vor stark abgekühlt wird, Interphase angereicherten Vermischen der Zellen in den verschiedenen Schichten zu verhindern.
- 30. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation in einem Gefäß durchgeführt wird, das durch eine poröse Barriere, einen Filter oder ein Sieb in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt ist, wobei das Zellsuspensionsmedium im unteren Kompartiment vorgelegt und die Körperflüssigkeit in das obere Kompartiment eingebracht wird.
  - 31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 5 mm aufweisen.
  - 32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Porengröße von 20-100  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 20-30  $\mu\text{m}$  aufweisen.
  - 33. Verfahren nach einem der Ansprüche 30-32, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb aus einem hydrophoben Material bestehen oder mit einem hydrophoben Material beschichtet sind.
  - 34. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-33, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium einen Farbstoff enthält, der das Zellseparationsmedium von der darüberliegenden Körperflüssigkeit farblich unterscheidbar

macht und dadurch die Lokalisation der Interphase vereinfacht.

- 35. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-34, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß bei dem genannten Verfahren zum einen eine venöse Blutprobe und zum anderen eine arterielle Blutprobe untersucht wird und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.
- 36. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-35, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß bei dem genannten Verfahren zum einen eine Blutprobe aus der Fingerkuppe und zum anderen eine venöse oder arterielle Blutprobe untersucht wird und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.
- 37. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-36, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen von Metastasen, vorzugsweise Mikrometastasen, maligner Tumore stammen.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1-37, 38. gekennzeichnet, daß die Tumorzellen aus einer Gruppe von Neoplasien und/oder Tumoren metastasierender ausgewählt werden, die von einem T-Zell-Lymphoblastom, T-Leukämiezellen, Zell-Leukämiezellen, chronisch myeloische lymphatische akute lymphatische Leukämiezellen, chronisch Lungenkarzinom, Teratokarzinom, Melanom, Leukämiezellen, Dickdarmkrebs, Brustkrebs, Leberzellkarzinom, Nierentumor, Neuroblastom, Prostatakarzinom, Nebennierentumor, Gehirntumor, Rhabdomyosarkom, Leiomyosarkom und/oder Lymphom abstammen.

- 39. Oligonukleotid-Primer mit der Sequenz
- 5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder
- 5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTTCTG 3' (hTRT2),

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können.

- 40. Oligonukleotid-Sonde mit der Sequenz
  - 5' CGTTCTGGCT CCCACGACGT AGTC 3' (hTRT 0)

und/oder die entsprechende reverse komplementäre Sequenz davon.

- 41. Kit zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, enthaltend:
- (a) ein Oligonukleotid-Primerpaar zur spezifischen Amplifizierung von Telomerase-kodierender Nukleinsäure.
  - 42. Kit nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid-Primerpaar gemäß (a) folgende Sequenzen hat:
  - 5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder 5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTTCTG 3' (hTRT2),

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthält.

43. Kit nach einem der Ansprüche 41 oder 42, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich (b) eine Standard-Nukleinsäure bzw. Standard-Nukleinsäuren zur Co-Amplifikation enthält.

54

dadurch 41-43, Ansprüche der einem nach Kit 44. markiertes zusätzlich ein er daß gekennzeichnet, Oligonukleotid zum Nachweis der amplifizierten Nukleinsäure der zu bestimmenden Probe und/oder ein oder mehrere markierte Oligonukleotide zum Nachweis der co-amplifizierten Standardenthält, Standard-Nukleinsäuren bzw. Nukleinsäure insbesondere ein Oligonukleotid mit der Sequenz:

# 5' CGTTCTGGCT CCCACGACGT AGTC 3' (hTRT 0)

und/oder die entsprechende reverse komplementäre Sequenz davon.

- dadurch 41-44, Ansprüche der einem nach Kit 45. gekennzeichnet, daß er zusätzlich eine reverse Transkriptase, eine DNA-Polymerase, vorzugsweise eine Taq-Polymerase, eine DNase und/oder geeignete Puffer und gegebenenfalls markierte Abreicherung zur gegebenenfalls und Nukleotide Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel enthält.
- 46. Kit nach einem der Ansprüche 41-45, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich eine reverse Transkriptase, eine RNA-Polymerase, vorzugsweise eine T7 RNA-Polymerase, eine RNase H, eine DNase und/oder geeignete Puffer und gegebenenfalls markierte Nukleotide und gegebenenfalls zur Abreicherung von Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel enthält.
- 47. Kit nach einem der Ansprüche 41-46, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich ein Zellseparationsmedium, das eine Dichte im Bereich von 1,055 bis < 1,070 g/ml aufweist, umfaßt, sowie gegebenenfalls ein Zentrifugationsgefäß.

55

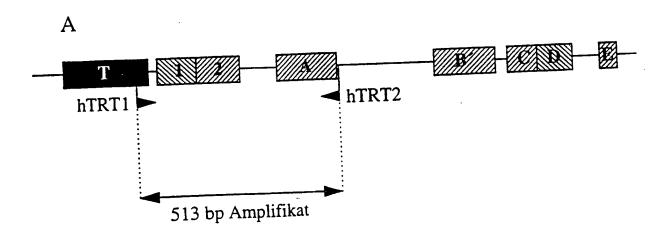
- 48. Kit nach Anspruch 47, worin das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,060 bis 1,067 g/ml und vorzugsweise von etwa 1,065 g/ml aufweist.
- 49. Kit nach einem der Ansprüche 47 oder 48, worin das Zentrifugationsgefäß eine poröse Barriere, einen Filter oder ein Sieb mit einer Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 5 mm aufweist, die das Zentrifugationsgefäß in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilen.
- 50. Kit nach Anspruch 49, worin die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Porengröße von 20-100  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 20-30  $\mu m$  aufweisen.
- das worin oder 50, 49 Anspruch nach 51. Kit Kompartiment des unteren Zellseparationsmedium im Zentrifugationsgefäßes befindet.

| 1       | GCAGCGCTGC               | GTCCTGCTGC                              | GCACGTGGGA   | AGCCCTGGCC                              | CCGGCCACCC                               | CCGCGATGCC                             |
|---------|--------------------------|---|--|---|--|--|
|         |                          |   | ACCMCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC   | [ '[ '[ '[ -]   '] ] = [ [ -] [ -]      | ALTE LALLAND                             | GCG13CG = GG =                         |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   | The first state of the first of the state of | (                                       | I GCC I GMAGG                            | *100*00                                |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          | ~~~~~~~~~                               | C'ETETET TO THE  | (                                       |  | 1000000                                |
|         |                          | * ~~~~~~~~~~~~                          | A C C C C A C P C A C C A  | しゃ ママムしか しかたし                           | GCGTGGGGC                                | 100100-                                |
|         |                          |   | יון ווין אין אין אין אין אין אין אין אין אין א   | (a) The et ALLSL.                       | TOCOCOCACA                               | 110100-00-                             |
|         |                          |   | בני עייייאר אייייאר  | (4) 1 1 4 1 1 4 1 1 1 7                 | TACCAGCICG                               | GCGCICGGGG                             |
|         |                          | ~~~~~~~~~                               | 7 (2) (2) (2) (2)  | ALT TOTAL                               | CGICIOGGUI                               | OCOLUMNO CO CO CO                      |
|         |                          |   | NCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC   | (                                       | LIGCEAGE                                 | C000100                                |
|         |                          |   | CCC3 ACTICITY  |   | AAGAGGCCCA                               | 0000000                                |
| 721     | TGCCCCTGAG               | CCAGIGCCA                               | CCCCCCTTCC   | GCAGGGGTCC                              | TGGGCCCACC                               | CGGGCAGGAC                             |
| 781     | TGCCCCTGAG<br>GCGTGGACCG | CCGGAGCGGA                              | CGCCCGIIGG   | CCTCTCACCT                              | GCCAGACCCG                               | CCGAAGAAGC                             |
| 841     | GCGTGGACCG               | AGTGACCGTG                              | GTTTCTGTGT   | CCCCACTCC                               | CACCCATCCG                               | TGGGCCGCCA                             |
| 901     | GCGTGGACCG<br>CACCTCTTTG | GAGGGTGCGC                              | TCTCTGGCAC   | CCCCACICC                               | CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC  | CCCTTGTCC                              |
| 961     | GCACCACGCG               | GGCCCCCCAT                              | CCACATCGCG   | GCCACCACGI                              | CCCIGGGACA                               | AGCAGCTGCG                             |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   | COLORA STATE OF THE STATE OF TH |   | GGCGCTCGG                                | 0000                                   |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          | m * ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ | THE PROPERTY OF THE PROPERTY O | (-11" " 1" 1   1   <b>-1.7ML</b>        | CIGCIIOCO                                | *****                                  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   | ם יזי <i>ויזי זי דו</i> אורי אורי אורים או   | 1 2 2 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 | CAL CACACACACACACACACACACACACACACACACACA | 110011-                                |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
| 1621    |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
| 1741    | TGTCACGGAG               | ACCACGITIC                              | MAAAGAACAG   | CTTGAAGAGG                              | GTGCAGCTGC                               | GGGAGCTGTC                             |
| 1801    | TGTCACGGAG<br>CAAGTTGCAA | <u>AGCA</u> TTGGAA                      | TCAGACAGCA   | CITGAAGAGG                              | CTCCTGACGT                               | CCAGACTCCG                             |
| 1861    |                          |   |  |   |  |  |
| 1921    |                          |   |  |   |  |  |
| 1981    |                          |   | ACACCCCCA  | (-CITIL ALL                             | I C G T G G G T G T G T                  | *****                                  |
|         |                          |   |  | 7777444                                 |  | 0.0.00                                 |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   | **************************************   | 'I'I i i a i a i la i la i l            |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
| 2341    | CGILICIACC               | CTCACAGACC                              | CCGTCGTCAT   | CGAGCAGAGC                              | TCCTCCCTGA                               | ATGAGGCCAG<br>GCATCAGGGG               |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
|         |                          |   |  |   |  |  |
| 2581    | CAGCCTGTGC               | TACGGCGACA                              |  | CCTCACACCT                              | CACCTCACCC                               | ACGCGAAAAC<br>ACTTGCGGAA               |
| 2641    | GCTCCTGCGT               | TTGGTGGATG                              | ATTICITGIT   | TCACTATCC                               | TECETEGIGA                               | ACTTGCGGAA                             |
| 2701    | CTTCCTCAGG               | ACCCTGGTCC                              | GAGGIGICCC   | . CCCCCTCCCT                            | GCACGGCTT                                | ACTTGCGGAA<br>TTGTTCAGAT<br>CCCTGGAGGT |
| 2761    | GACAGTGGTG               | AACTTCCCTG                              | TAGAAGACGA   | CCCCIGGGI                               | CATACCCGGA                               | CCCTGGAGGT<br>CCTTCAACCG               |
| 2821    | GCCGGCCCAC               | GGCCTATTCC                              | CCTGGTGCGG   | CCIGCIGCIG                              | CCCAGTCTCA                               | CCTTCAACCG                             |
| 2881    | GCAGAGCGAC               | TACTCCAGCT                              | ' ATGCCCGGAC   | CICCATCAGA                              | ' CCCTGICICE                             | CCTTCAACCG<br>GGCTGAAGTG               |
| 2941    | . CGGCTTCAAG             | GCTGGGAGGA                              | ACATGCGTCC   | CAAACTCTT                               | _ GGGGIC-1G(                             | GGCTGAAGTG<br>A CCAACATCTA             |
| 3001    | TCACAGCCTS               | TTTCTGGATI                              | TGCAGGTGA  | A CAGCCTCCAC                            | ACGGTGIGCA                               | CCAACATCTA TCCCATTTCA                  |
| 3061    | CAAGATCCTC               | CTGCTGCAGG                              | CGTACAGGT  | r TCACGCATG                             | r Greerener                              | TCCCATTTCA<br>A CGGCCTCCCT             |
| 3121    | TCAGCAAGTT               | TGGAAGAACC                              | CCACATTTT  | r CCTGCGCGTC                            | ATCTCTGACA                               | A CGGCCTCCCT<br>A AGGGCGCCGC           |
| 3121    | CTGCTACTCC               | ATCCTGAAAG                              | CCAAGAACG  | AGGGATGTC                               | CTGGGGGCCA                               | A AGGGCGCCGC<br>TGCTCAAGCT             |
| 3241    |                          | CCCTCCGAGO                              | CCGTGCAGT  | G GCTGTGCCA                             | CAAGCATIC                                | TGCTCAAGCT CCCAGACGCA                  |
| 3201    | CACCCCICIC               | CGTGTCACCT                              | ACGTGCCAC  | r cctggggtc                             | A CTCAGGACA                              | G CCCAGACGCA                           |
| ر ن د د | . GRUZCOROWI             |   |  |   |  |  |

2 / 12

| 3421<br>3481<br>3541<br>3601<br>3661<br>3721<br>3781<br>3841 | GAGCAGACAC<br>CACACCCAGG<br>CATGTCCGGC<br>GAGTGTCCAG<br>GGGCCAGCTT<br>CCAGATTCGC | GACTTCAAGA CAGCAGCCCT CCCGCACCGC TGAAGGCTGA CACACCTGCC TTCCTCACCA CATTGTTCAC CCTGAGAGAGG | CCATCCTGGA GTCACGCCGG TGGGAGTCTG GTGTCCGGCT GGAGCCCGGC CCCTCGCCCT ACCCTGGGAG | GCTCTACGTC AGGCCTGAGT GAGGCCTGAG CCCCACAGGC TTCCACTCCC GCCCTCCTTT CTCTGGGAAT GATGGGGGTC | CCAGGGAGGG GAGTGTTTGG CGAGTGTCCA TGGCGCTCGG CACATAGGAA GCCTTCCACC TTGGAGTGAC CCTGTGGGTC | AGGGGCGGCC<br>CCGAGGCCTG<br>GCCAAGGGCT<br>CTCCACCCA<br>TAGTCCATCC<br>CCCACCATCC<br>CAAAGGTGTG<br>AAATTGGGGG |
|--|--|--|--|---|---|---|
|--|--|--|--|---|---|---|

Abb. 1b



В

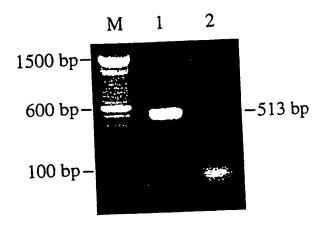
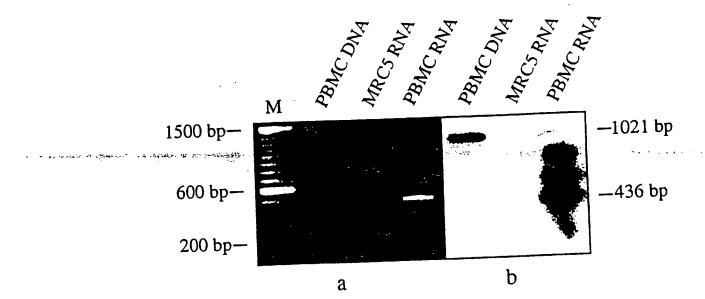
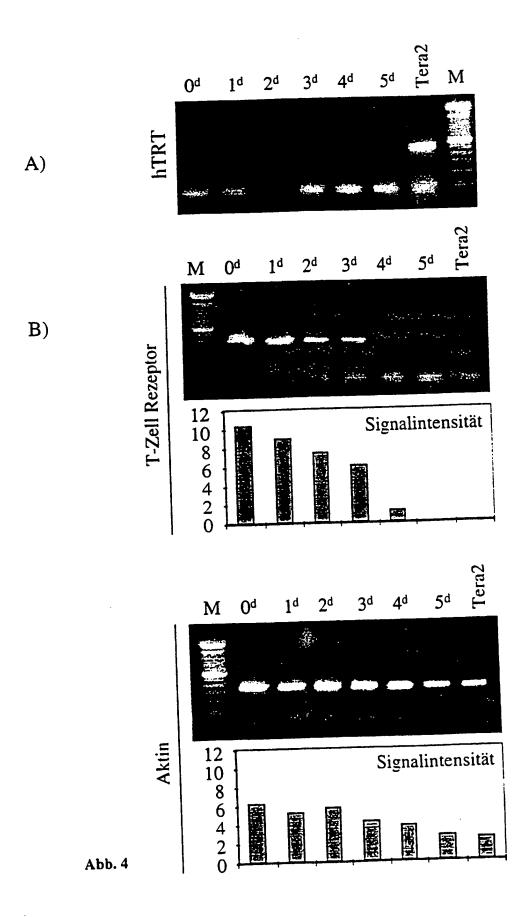
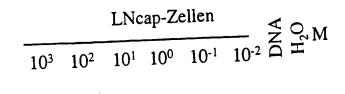


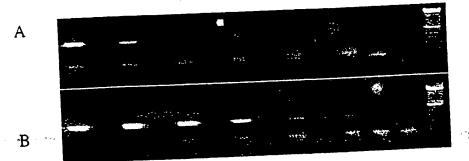
Abb. 2





WO 99/40221





# Katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase:

| Katalytische of            |  |
|----------------------------|--|
| Name                       | Sequenz (5`-3)   |
| hTRT 1<br>hTRT 2<br>hTRT 0 | CTACCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTGCAAAGC<br>GGCATACCGACGCACGCAGTACGTGTTCTG<br>CGTTCTGGCTCCCACGACGTAGTC |

## T-Zell-Rezeptor:

| T-Zell-Kercheel |  |
|-----------------|--|
| Name            | Sequenz (5'-3)   |
| TCR 1<br>TCR 2  | GAGGTCGCTGTTTTGAGCCATCAGAAG<br>GATCTCATAGAGGATGGTGGCAGACAG |
|                 |  |

## $\beta$ -Aktin:

| p-ARCIII. | Sequenz (5'-3)            |
|-----------|---------------------------|
| Act 1     | GATGATGATATCGCCGCGCTCGTC  |
| Act 2     | CTCAAACATGATCTGGGTCATCTTC |

## $\beta$ -Globin:

| p 0102111        |  |             |
|------------------|--|-------------|
| Name             | Sequenz (5`-3)                               | <del></del> |
| Glob 1<br>Glob 2 | ACCCAGAGGTTCTTTGAGTC<br>TCTGATAGGCAGCCTGCACT |             |

# Vollblut/Ficoll-isolierte PBMC

RNA-Isolierung mit "Vollblut-Protokoll" oder Standardmethoden wie Phenol/Chloroform oder Silicagelsäule

#### total RNA

Menge RNA die einem bestimmten Vol. (z.B. 1 ml) Vollblut entspricht

Buffer: 100 mM Tris/Cl,

pH 8.3

50 mM KCl 5 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM dNTP-Mix

2.5 µM Random Hexamer 4U Rnase-freie DNase 40U RNase Inhibitor in 36 µl Volumen

DNase-Verdau 30'/37°C, 10'/75°, 10"/90°C

 $\rightarrow$  sofort auf Eis

Probe (18 μl) Negativ-Kontrolle (18 μl)

- + 50U MuLV RT
- + 40U Rnase Inhibitor

4 µl DEPC Wasser

30'/42°C, 5'/99°

Reverse Traskriptase Reaktion

(cDNA) cDNA

Buffer: 100 mM Tris/Cl,

pH 8.3

50 mM KCl 2 mM MgCl<sub>2</sub>

200 µM dNTP-Mix

2.5U AmpliTaq DNA Analyse/Quantifizierung Polymerase

300 µM je Primer in 25 µl Volumen PCR-Reaktion 1)

# 1) PCR-Konditionen:

15"/97°C(15"/97°C,30"/70°C,-0.5°C/cycle,30"/72°C)x10 (15"/94°C,30"/65°C,-0.5°C/cycle,30"/72°C)x20 (15"/94°C,30"/50°C,30"(ext.15"/cycle)/72°C)x10



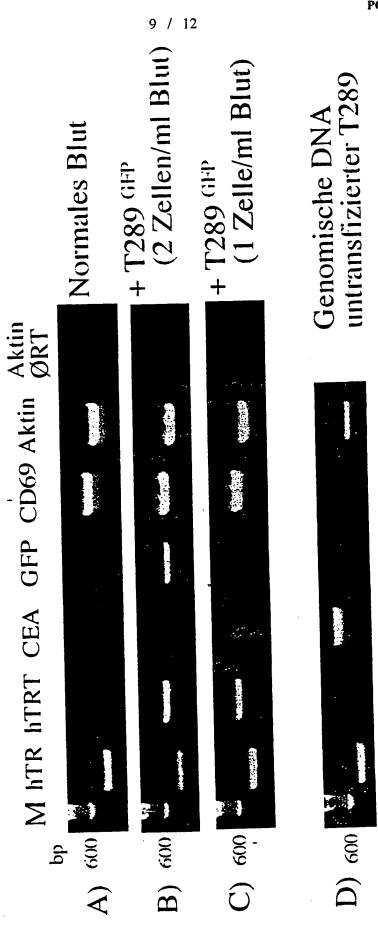
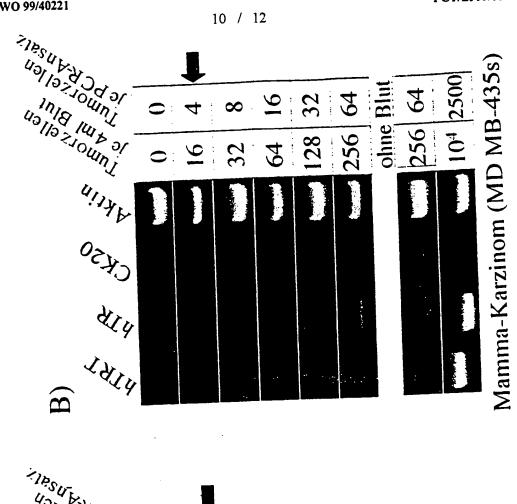
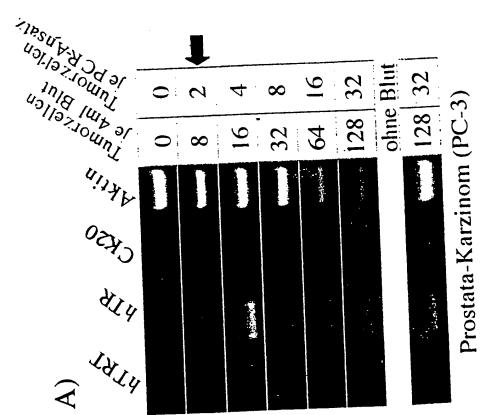


Abb. 8





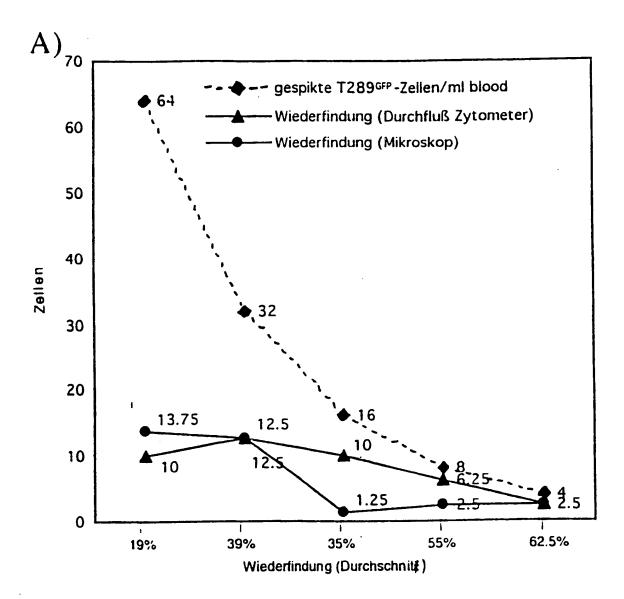


Abb. 10

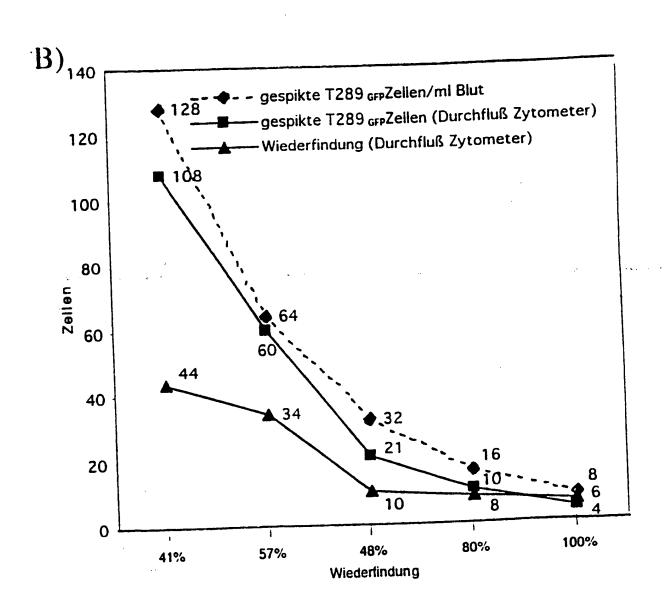


Abb. 10

#### SEQUENZPROTOKOLL

# (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

#### ANMELDER:

- (A) NAME: Dr. Dr. Michael Dahm
- (B) STRASSE: Gleimstr.2
- (C) ORT: München
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 81677

#### ANMELDETITEL:

Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit und dazu geeignete Testkits

# ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

## COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy Disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PADAT Sequenzmodul Version 1.0

| (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:   |                  |
|--|------------------|
| <ul> <li>(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:</li> <li>(A) LÄNGE: 34 Basenpaare</li> <li>(B) ART: Nukleinsäure</li> <li>(C) STRANGFORM: Einzel</li> <li>(D) TOPOLOGIE: linear</li> </ul> |                  |
| (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA   |                  |
| (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1: CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC  | 34               |
| (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:   |                  |
| (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  (A) LÄNGE: 30 Basenpaare  (B) ART: Nukleinsäure  (C) STRANGFORM: Einzel  (D) TOPOLOGIE: linear   | e gasta te de de |
| (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA   |                  |
| (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:  | 30               |
| GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTTCTG   | 30               |
| (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:   |                  |
| (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  (A) LÄNGE: 20 Basenpaare  (B) ART: Nukleinsäure  (C) STRANGFORM: Einzel  (D) TOPOLOGIE: linear   |                  |
| (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA   |                  |
| (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:  | 20               |
| ACCCAGAGGT TCTTTGAGTC  |                  |

| (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:   |     |
|--|-----|
| <ul> <li>(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:</li> <li>(A) LÄNGE: 20 Basenpaare</li> <li>(B) ART: Nukleinsäure</li> <li>(C) STRANGFORM: Einzel</li> <li>(D) TOPOLOGIE: linear</li> </ul>                     |     |
| (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA   |     |
| (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:  | 20  |
| TCTGATAGGC AGCCTGCACT  | 20  |
| (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:   |     |
| <ul> <li>(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:         <ul> <li>(A) LÄNGE: 24 Basenpaare</li> <li>(B) ART: Nukleinsäure</li> <li>(C) STRANGFORM: Einzel</li> <li>(D) TOPOLOGIE: linear</li> </ul> </li> </ul> |     |
| (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA   |     |
| (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:  | 2.4 |
| GATGATGATA TCGCCGCGCT CGTC   | 24  |
| (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:   |     |
| <ul> <li>(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:</li> <li>(A) LÄNGE: 25 Basenpaare</li> <li>(B) ART: Nukleinsäure</li> <li>(C) STRANGFORM: Einzel</li> <li>(D) TOPOLOGIE: linear</li> </ul>                     |     |
| (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA   |     |
| (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:  | 25  |
| CTCAAACATG ATCTGGGTCA TCTTC  |     |

| (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:   |           |
|--|-----------|
| <ul> <li>(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:</li> <li>(A) LÄNGE: 28 Basenpaare</li> <li>(B) ART: Nukleinsäure</li> <li>(C) STRANGFORM: Einzel</li> <li>(D) TOPOLOGIE: linear</li> </ul> |           |
| (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA   |           |
| (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7: GAGGTCGCTG TGTTTGAGCC ATCAGAAG   | 28        |
| (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:   |           |
| (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  (A) LÄNGE: 27 Basenpaare  (B) ART: Nukleinsäure  (C) STRANGFORM: Einzel  (D) TOPOLOGIE: linear   | , <b></b> |
| (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA   |           |
| (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:  | 27        |
| GATCTCATAG AGGATGGTGG CAGACAG  |           |
| (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:   |           |
| <ul> <li>(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:</li> <li>(A) LÄNGE: 24 Basenpaare</li> <li>(B) ART: Nukleinsäure</li> <li>(C) STRANGFORM: Einzel</li> <li>(D) TOPOLOGIE: linear</li> </ul> |           |
| (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA   |           |
| (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:  |           |
| CGTTCTGGCT CCCACGACGT AGTC   | 24        |

# (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 4015 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GCAGCGCTGC GTCCTGCTGC GCACGTGGGA AGCCCTGGCC CCGGCCACCC CCGCGATGCC 60 GCGCGCTCCC CGCTGCCGAG CCGTGCGCTC CCTGCTGCGC AGCCACTACC GCGAGGTGCT 120 GCCGCTGGCC ACGTTCGTGC GGCGCCTGGG GCCCCAGGGC TGGCGGCTGG TGCAGCGCGG 180 GGACCCGGCG GCTTTCCGCG CGCTGGTGGC CCAGTGCCTG GTGTGCGTGC CCTGGGACGC ACGGCCGCCC CCCGCCGCCC CCTCCTTCCG CCAGGTGTCC TGCCTGAAGG AGCTGGTGGC 300 CCGAGTGCTG CAGAGGCTGT GCGAGCGCGG CGCGAAGAAC GTGCTGGCCT TCGGCTTCGC 360 GCTGCTGGAC GGGGCCCGCG GGGGCCCCCC CGAGGCCTTC ACCACCAGCG TGCGCAGCTA 420 CCTGCCCAAC ACGGTGACCG ACGCACTGCG GGGGAGCGGG GCGTGGGGGC TGCTGCTGCG 480 CCGCGTGGGC GACGACGTGC TGGTTCACCT GCTGGCACGC TGCGCGCTCT TTGTGCTGGT 540 GGCTCCCAGC TGCGCCTACC AGGTGTGCGG GCCGCCGCTG TACCAGCTCG GCGCTGCCAC 600 TCAGGCCCGG CCCCCGCCAC ACGCTAGTGG ACCCCGAAGG CGTCTGGGAT GCGAACGGGC 660 CTGGAACCAT AGCGTCAGGG AGGCCGGGGT CCCCCTGGGC CTGCCAGCCC CGGGTGCGAG 720 GAGGCGCGGG GGCAGTGCCA GCCGAAGTCT GCCGTTGCCC AAGAGGCCCA GGCGTGGCGC 780 TGCCCTGAG CCGGAGCGGA CGCCCGTTGG GCAGGGGTCC TGGGCCCACC CGGGCAGGAC 840 GCGTGGACCG AGTGACCGTG GTTTCTGTGT GGTGTCACCT GCCAGACCCG CCGAAGAAGC 900 CACCTCTTTG GAGGGTGCGC TCTCTGGCAC GCGCCACTCC CACCCATCCG TGGGCCGCCA GCACCACGCG GGCCCCCCAT CCACATCGCG GCCACCACGT CCCTGGGACA CGCCTTGTCC 1020 CCCGGTGTAC GCCGAGACCA AGCACTTCCT CTACTCCTCA GGCGACAAGG AGCAGCTGCG 1080 GCCCTCCTTC CTACTCAGCT CTCTGAGGCC CAGCCTGACT GGCGCTCGGA GGCTCGTGGA 1140 GACCATCTTT CTGGGTTCCA GGCCCTGGAT GCCAGGGACT CCCCGCAGGT TGCCCCGCCT 1200 GCCCCAGCGC TACTGGCAAA TGCGGCCCCT GTTTCTGGAG CTGCTTGGGA ACCACGCGCA 1260

GTGCCCCTAC GGGGTGCTCC TCAAGACGCA CTGCCCGCTG CGAGCTGCGG TCACCCCAGC 1320 AGCCGGTGTC TGTGCCCGGG AGAAGCCCCA GGGCTCTGTG GCGGCCCCCG AGGAGGAGGA 1380 CACAGACCCC CGTCGCCTGG TGCAGCTGCT CCGCCAGCAC AGCAGCCCCT GGCAGGTGTA 1440 CGGCTTCGTG CGGGCCTGCC TGCGCCGGCT GGTGCCCCCA GGCCTCTGGG GCTCCAGGCA 1500 CAACGAACGC CGCTTCCTCA GGAACACCAA GAAGTTCATC TCCCTGGGGA AGCATGCCAA 1560 GCTCTCGCTG CAGGAGCTGA CGTGGAAGAT GAGCGTGCGG GACTGCGCTT GGCTGCGCAG 1620 GAGCCCAGGG GTTGGCTGTG TTCCGGCCGC AGAGCACCGT CTGCGTGAGG AGATCCTGGC 1680 CAAGTTCCTG CACTGGCTGA TGAGTGTGTA CGTCGTCGAG CTGCTCAGGT CTTTCTTTTA 1740 TGTCACGGAG ACCACGTTTC AAAAGAACAG GCTCTTTTTC TACCGGAAGA GTGTCTGGAG 1800 CAAGTTGCAA AGCATTGGAA TCAGACAGCA CTTGAAGAGG GTGCAGCTGC GGGAGCTGTC 1860 GGAAGCAGAG GTCAGGCAGC ATCGGGAAGC CAGGCCCGCC CTGCTGACGT CCAGACTCCG 1920 CTTCATCCCC AAGCCTGACG GGCTGCGGCC GATTGTGAAC ATGGACTACG TCGTGGGAGC 1980 CAGAACGTTC CGCAGAGAAA AGAGGGCCGA GCGTCTCACC TCGAGGGTGA AGGCACTGTT 2040 CAGCGTGCTC AACTACGAGC GGGCGCGGCG CCCCGGCCTC CTGGGCGCCT CTGTGCTGGG 2100 CCTGGACGAT ATCCACAGGG CCTGGCGCAC CTTCGTGCTG CGTGTGCGGG CCCAGGACCC 2160 GCCGCCTGAG CTGTACTTTG TCAAGGTGGA TGTGACGGGC GCGTACGACA CCATCCCCCA 2220 GGACAGGCTC ACGGAGGTCA TCGCCAGCAT CATCAAACCC CAGAACACGT ACTGCGTGCG 2280 TCGGTATGCC GTGGTCCAGA AGGCCGCCCA TGGGCACGTC CGCAAGGCCT TCAAGAGCCA 2340 CGTCTCTACC TTGACAGACC TCCAGCCGTA CATGCGACAG TTCGTGGCTC ACCTGCAGGA 2400 GACCAGCCCG CTGAGGGATG CCGTCGTCAT CGAGCAGAGC TCCTCCCTGA ATGAGGCCAG 2460 CAGTGGCCTC TTCGACGTCT TCCTACGCTT CATGTGCCAC CACGCCGTGC GCATCAGGGG 2520 CAAGTCCTAC GTCCAGTGCC AGGGGATCCC GCAGGGCTCC ATCCTCTCCA CGCTGCTCTG 2580 CAGCCTGTGC TACGGCGACA TGGAGAACAA GCTGTTTGCG GGGATTCGGC GGGACGGGCT 2640 GCTCCTGCGT TTGGTGGATG ATTTCTTGTT GGTGACACCT CACCTCACCC ACGCGAAAAC 2700 CTTCCTCAGG ACCCTGGTCC GAGGTGTCCC TGAGTATGGC TGCGTGGTGA ACTTGCGGAA 2760 GACAGTGGTG AACTTCCCTG TAGAAGACGA GGCCCTGGGT GGCACGGCTT TTGTTCAGAT 2820 GCCGGCCCAC GGCCTATTCC CCTGGTGCGG CCTGCTGCTG GATACCCGGA CCCTGGAGGT 2880 GCAGAGCGAC TACTCCAGCT ATGCCCGGAC CTCCATCAGA GCCAGTCTCA CCTTCAACCG 2940 CGGCTTCAAG GCTGGGAGGA ACATGCGTCG CAAACTCTTT GGGGTCTTGC GGCTGAAGTG 3000 TCACAGCCTG TTTCTGGATT TGCAGGTGAA CAGCCTCCAG ACGGTGTGCA CCAACATCTA 3060 CAAGATCCTC CTGCTGCAGG CGTACAGGTT TCACGCATGT GTGCTGCAGC TCCCATTTCA 3120 TCAGCAAGTT TGGAAGAACC CCACATTTTT CCTGCGCGTC ATCTCTGACA CGGCCTCCCT 3180 CTGCTACTCC ATCCTGAAAG CCAAGAACGC AGGGATGTCG CTGGGGGCCCA AGGGCGCCGC 3240 CGGCCCTCTG CCCTCCGAGG CCGTGCAGTG GCTGTGCCAC CAAGCATTCC TGCTCAAGCT 3300 GACTCGACAC CGTGTCACCT ACGTGCCACT CCTGGGGTCA CTCAGGACAG CCCAGACGCA 3360 GCTGAGTCGG AAGCTCCCGG GGACGACGCT GACTGCCCTG GAGGCCGCAG CCAACCCGGC 3420 ACTGCCCTCA GACTTCAAGA CCATCCTGGA CTGATGGCCA CCCGCCCACA GCCAGGCCGA 3480 GAGCAGACAC CAGCAGCCCT GTCACGCCGG GCTCTACGTC CCAGGGAGGG AGGGGCGGCC 3540 CACACCCAGG CCCGCACCGC TGGGAGTCTG AGGCCTGAGT GAGTGTTTGG CCGAGGCCTG 3600 CATGTCCGGC TGAAGGCTGA GTGTCCGGCT GAGGCCTGAG CGAGTGTCCA GCCAAGGGCT 3660 GAGTGTCCAG CACACCTGCC GTCTTCACTT CCCCACAGGC TGGCGCTCGG CTCCACCCCA 3720 GGGCCAGCTT TTCCTCACCA GGAGCCCGGC TTCCACTCCC CACATAGGAA TAGTCCATCC 3780 CCAGATTCGC CATTGTTCAC CCCTCGCCCT GCCCTCCTTT GCCTTCCACC CCCACCATCC 3840 AGGTGGAGAC CCTGAGAAGG ACCCTGGGAG CTCTGGGAAT TTGGAGTGAC CAAAGGTGTG 3900 CCCTGTACAC AGGCGAGGAC CCTGCACCTG GATGGGGGTC CCTGTGGGTC AAATTGGGGG 3960 4015 GAGGTGCTGT GGGAGTAAAA TACTGAATAT ATGAGTTTTT CAGTTTTGAA AAAAA

## WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro
TIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

WO 99/40221 (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: (51) Internationale Patentklassifikation 6: **A3** C12O 1/68 (43) Internationales 12. August 1999 (12.08.99) Veröffentlichungsdatum:

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/00716

(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1999 (03.02.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 04 372.4

4. Februar 1998 (04.02.98)

DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE]; Gleimstrasse 2, D-81677 München (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PHELPS, Robert, C. [US/DE]; Ostpreussenweg 14, D-61118 Bad Vilbel (DE). BROCKMEYER, Carsten [DE/DE]; Fellerer Strasse 2, D-85354 Freising (DE).
- (74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregentenstrasse 16, D-80538 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-14. Oktober 1999 (14.10.99) richts:

- (54) Title: METHOD FOR QUANTITATIVELY ANALYZING TUMOR CELLS IN A BODY FLUID AND TEST KITS SUITED THEREFOR
- EINER IN VON TUMORZELLEN **BESTIMMUNG** (54) Bezeichnung: VERFAHREN QUANTITATIVEN ZUR KÖRPERFLÜSSIGKEIT UND DAZU GEEIGNETE TESTKITS

#### (57) Abstract

The invention relates to a method for quantitatively analyzing tumor cells in a body fluid. According to the inventive method, the test sample to be examined is first subjected to a method for accumulating or depleting tumor cells, and a reaction is carried out on the accumulated or depleted tumor cells. During the reaction, the mRNA which codes for the catalytic subunit of the telomerase is specifically amplified, and afterwards, the quantity of amplified nucleic acid is quantitatively analyzed. The invention also relates to test kits suited for the invented method.

#### (57) Zusammenfassung

Offenbart wird ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst die zu untersuchende Probe einem Verfahren zur An- bzw. Abreicherung von Tumorzellen unterzogen wird und an den angereicherten bzw. abgereicherten Tumorzellen eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierende mRNA spezifisch amplifiziert wird, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| AL | Alhanien                     | ES | Spanien                     | LS | Lesotho                                 | SI  | Slowenien              |
|----|------------------------------|----|-----------------------------|----|---|-----|------------------------|
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                    | LT | Litauen                                 | SK  | Slowakei               |
|    | Österreich                   | FR | Frankreich                  | LU | Luxemburg                               | SN  | Senegal                |
| AT | <del>+ -</del>               | GA | Gabun                       | LV | Lettland                                | SZ  | Swasiland              |
| AÜ | Australien<br>Aserbaidschan  | GB | Vereinigtes Königreich      | MC | Monaco                                  | TD  | Tschad                 |
| AZ |                              | GE | Georgien                    | MD | Republik Moldau                         | TG  | Togo                   |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GH | Ghana                       | MG | Madagaskar                              | TJ  | Tadschikistan          |
| BB | Barbados                     | GN | Guinea                      | MK | Die ehemalige jugoslawische             | TM  | Turkmenistan           |
| BE | Belgien                      | GR | Griechenland                |    | Republik Mazedonien                     | TR  | Türkei                 |
| BF | Burkina Faso                 | _  |                             | ML | Mali                                    | TT  | Trinidad und Tobago    |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                      | MN | Mongolei                                | UA  | Ukraine                |
| BJ | Benin                        | 1E | Irland                      | MR | Mauretanien                             | UG  | Uganda                 |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                      | MW | Malawi                                  | US  | Vereinigte Staaten von |
| BY | Belarus                      | IS | Island                      |    | Maiawi<br>Mexiko                        | 0.5 | Amerika                |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                     | MX | • | UZ. | Usbekistan             |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                       | NE | Niger                                   | VN  | Vietnam                |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                       | NL | Niederlande                             |     |                        |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                 | NO | Norwegen                                | YU  | Jugoslawien            |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik | NZ | Neuseeland                              | zw  | Zimbabwe               |
| CM | Kamerun                      |    | Korea                       | PL | Polen                                   |     |                        |
| CN | China                        | KR | Republik Korea              | PT | Portugal                                |     |                        |
| CU | Kuba                         | KZ | Kasachstan                  | RO | Rumānien                                |     |                        |
| CZ | Tschechische Republik        | LC | St. Lucia                   | RU | Russische Föderation                    |     |                        |
| DE | Deutschland                  | LI | Liechtenstein               | SD | Sudan                                   |     |                        |
| DK | Dånemark                     | LK | Sri Lanka                   | SE | Schweden                                |     |                        |
| EE | Estland                      | LR | Liberia                     | SG | Singapur                                |     |                        |



PCT/EP 99/00716

| A. CLASSIFI   | ICATION OF SUBJECT MATTER<br>C12Q1/68   |   |   |
|---|---|---|---|
| According to  | International Patent Classification (IPC) or to both national classific   | cation and IPC  |   |
| B. FIELDS S   | SEARCHED  |   |   |
| Minimum doc<br>IPC 6  | cumentation searched (classification system followed by classificat ${\tt C12Q}$  | tion symbols)   |   |
| Documentation   | on searched other than minimum documentation to the extent that   | such documents are included in the fields sea   | arched  |
| Electronic da   | ita base consulted during the international search (name of data b  | ase and, where practical, search terms used)  |   |
| C. DOCUME   | NTS CONSIDERED TO BE RELEVANT   |   |   |
| Category °  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the r  | relevant passages   | Relevant to claim No.   |
| Υ   | MEYERSON M ET AL: "hEST2, THE F<br>HUMAN TELOMERASE CATALYTIC SUBUN<br>IS UP -REGULATED IN TUMOR CELLS<br>IMMORTALIZATION"<br>CELL,<br>vol. 90, no. 4,<br>22 August 1997 (1997-08-22), pag<br>785-795, XP002056804<br>ISSN: 0092-8674<br>cited in the application<br>the whole document | NIT GENE,<br>AND DURING   | 1-51  |
| ▼ Fur   | ther documents are listed in the continuation of box C.   | χ Patent family members are listed  | in annex.   |
| * Special c  *A* docurrence onsi *E* earlier filing *L* docurrence which cutati *O* docurrence on their control to their cutations of their cut | ategories of cited documents : nent defining the general state of the art which is not idered to be of particular relevance document but published on or after the international  | "T' later document published after the intor priority date and not in conflict wit cited to understand the principle of the invention."  "X" document of particular relevance: the cannot be considered novel or canninvolve an inventive step when the distribution of particular relevance: the cannot be considered to involve an document of particular relevance: the cannot be considered to involve an document is combined with one or ments, such combination being obvious the art.  "&" document member of the same pater.  Date of mailing of the international same pater. | ernational filing date in the application but neory underlying the claimed invention to be considered to occument is taken alone claimed invention inventive step when the nore other such docu- ous to a person skilled int family |
| <u></u>   | 25 August 1999  | 02/09/1999  |   |
| Name and  | d mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  NL - 2280 HV Rijswijk  Tel. (-31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.   | Authorized officer Hagenmaier, S  |   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/00716

| C (Continu |   |                         |
|------------|---|-------------------------|
|            | ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  | Relevant to claim No.   |
| Category " | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | TIGISTALL O CIAITI 110. |
| Y          | NAKAMURA T M ET AL: "TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT HOMOLOGS FROM FISSION YEAST AND HUMAN" SCIENCE, vol. 277, 15 August 1997 (1997-08-15), pages 955-959, XP002056803 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document                     | 1-51                    |
| Y          | WO 97 18322 A (DAHM MICHAEL W) 22 May 1997 (1997-05-22) cited in the application the whole document   | 1-51                    |
| Υ          | WO 96 01835 A (ANDREWS WILLIAM H<br>;VILLEPONTEAU BRYANT (US); FUNK WALTER<br>(US); FEN) 25 January 1996 (1996-01-25)<br>the whole document<br>   | 1-51                    |
| Α          | KIM N W ET AL: "SPECIFIC ASSOCIATION OF HUMAN TELOMERASE ACTIVITY WITH IMMORTAL CELLS AND CANCER" SCIENCE, vol. 266, 23 December 1994 (1994-12-23), pages 2011-2015, XP002028668 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document        |                         |
| Α          | BLASCO M A ET AL: "DIFFERENTIAL REGULATION OF TELOMERASE ACTIVITY AND TELOMERASE RNA DURING MULTI-STAGE TUMORIGENESIS" NATURE GENETICS, vol. 12, no. 2, 1 February 1996 (1996-02-01), pages 200-204, XP000673791 ISSN: 1061-4036 the whole document |                         |
| Ρ,Χ        | WO 98 37181 A (COUNTER CHRISTOPHER M; WEINBERG ROBERT A (US); WHITEHEAD BIOMEDICA) 27 August 1998 (1998-08-27) the whole document   | 1-51                    |
| Р,Х        | WO 98 59040 A (WICK MARESA ;BAYER AG (DE); HAGEN GUSTAV (DE); WEICHEL WALTER (DE)) 30 December 1998 (1998-12-30) see PCR Primer C5A and GSP2 the whole document   | 1-51                    |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/00716

|            |   | PCI/EF 99/ |                      |
|------------|---|------------|----------------------|
| .(Continu  | ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  | le le      | elevant to claim No. |
| alegory "  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  |            | Clot and to Cloth    |
| · , X      | GB 2 317 891 A (GERON CORP ;UNIV<br>TECHNOLOGY CORP (US))<br>8 April 1998 (1998-04-08)<br>see hTRT PCR Primer<br>the whole document |            | 1-51                 |
| , <b>X</b> | WO 98 14592 A (ANDREWS WILLIAM H ;CECH THOMAS R (US); MORIN GREGG B (US); NAKAMUR) 9 April 1998 (1998-04-09) the whole document     |            | 1-51                 |
| . 6.7.     |   |            |                      |
|            | ·   |            |                      |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

er i sara e de

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/00716

| Patent document |   | Publication    |  | tent family<br>ember(s)  | Publication date   |
|-----------------|---|----------------|--|--|--|
| WO 9718322      | A | 22-05-1997     | AU<br>CA<br>CN<br>DE   | 1867397 A<br>2237589 A<br>1202206 A<br>19681033 D  | 05-06-1997<br>22-05-1997<br>16-12-1998<br>18-03-1999   |
| WO 9601835      | Α | <br>25-01-1996 | EP US US AU AU AU BG BR CA                                     | 19661033 b<br>0861334 A<br>5583016 A<br>5776679 A<br>696702 B<br>2964795 A<br>3095095 A<br>9712998 A<br>101103 A<br>9508254 A<br>2194393 A<br>1158617 A                          | 02-09-1998<br>   |
|                 |   |                | CN<br>CZ<br>EP<br>EP<br>FI<br>JP<br>NO<br>NZ<br>PL<br>WO<br>US | 1168617 A<br>1168696 A<br>9700034 A<br>0778842 A<br>0793719 A<br>970026 A<br>10505488 T<br>10507067 T<br>970041 A<br>289720 A<br>318169 A<br>9601614 A<br>5876979 A<br>5837857 A | 24-12-1997<br>15-10-1997<br>18-06-1997<br>10-09-1997<br>03-03-1997<br>02-06-1998<br>14-07-1998<br>06-03-1997<br>29-03-1999<br>26-05-1997<br>25-01-1998<br>02-03-1999<br>17-11-1998 |
| WO 9837181      | Α | 27-08-1998     | NONE   |  |  |
| WO 9859040      | Α | 30-12-1998     | AU   | 8214998 A  | 04-01-1999   |
| GB 2317891      | A | 08-04-1998     | AU<br>CH<br>DE<br>DE<br>EP<br>FI<br>FR<br>GB<br>JP<br>NO<br>WO | 4803697 A<br>4807397 A<br>689672 A<br>19743497 A<br>841396 T<br>0841396 A<br>0932686 A<br>990655 A<br>2757177 A<br>2321642 A<br>10234384 A<br>991588 A<br>9814592 A<br>9814593 A | 24-04-1998<br>24-04-1998<br>13-08-1999<br>20-08-1998<br>24-09-1998<br>13-05-1998<br>04-08-1999<br>24-03-1999<br>19-06-1998<br>05-08-1998<br>08-09-1998<br>31-05-1999<br>09-04-1998 |
| WO 9814592      | A | 09-04-1998     | AU<br>CH<br>DE<br>DE<br>EP<br>FI<br>FR                         | 4803697 A<br>4807397 A<br>689672 A<br>19743497 A<br>841396 T<br>0841396 A<br>0932686 A<br>990655 A<br>2757177 A  | 24-04-1998<br>24-04-1998<br>13-08-1999<br>20-08-1998<br>24-09-1998<br>13-05-1998<br>04-08-1999<br>24-03-1999<br>19-06-1998   |



Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/00716

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s)  | Publication<br>date  |
|--|------------------|--|--|
| WO 9814592 A                           |                  | GB 2317891 A,B<br>GB 2321642 A<br>JP 10234384 A<br>NO 991588 A<br>WO 9814593 A | 08-04-1998<br>05-08-1998<br>08-09-1998<br>31-05-1999<br>09-04-1998 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

Inte. .tionales Aktenzeichen PCT/EP 99/00716

| A. KLASSIF<br>IPK 6   | IZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES<br>C1201/68  |  |   |
|---|--|--|---|
| Nach der Inte   | ernationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassif   | likation und der IPK   |   |
|   | CHIERTE GEBIETE  |  |   |
| Recherchiert<br>IPK 6   | ler Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole C12Q  | )  |   |
| Recherchiert  | te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröftentlichungen, sowi  | eit diese unter die recherchierten Gebiete   | allen   |
| Während de  | r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Nar  | ne der Datenbank und evtl. verwendete S  | uchbegnfle)   |
| C. ALS WE   | SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN   |  |   |
| Kategorie*  | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe   | der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr.  |
| Y   | MEYERSON M ET AL: "hEST2, THE PUT HUMAN TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT IS UP -REGULATED IN TUMOR CELLS AN IMMORTALIZATION" CELL, Bd. 90, Nr. 4, 22. August 1997 (1997-08-22), Seit 785-795, XP002056804 ISSN: 0092-8674 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument  | GENE,<br>ND DURING   | 1-51  |
|   | itere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu<br>nehmen  | X Siehe Anhang Patentfamilie   |   |
| * Besonder  "A" Veröffe aber i  "E" ätteres Anme "L" Veröffe scheil ander soll o ausge "O" Veröffe dem i  Datum des | re Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen intilichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist. Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen eldedatum veröffentlicht worden ist entlichung, die geeignet ist, einen Priontatsanspruch zweifelhaft ernen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbencht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie eführt) entlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht entlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach beanspruchten Prioritatsdatum veröffentlicht worden ist. | T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prionitalsdaturn veröffentlich Anmeldung nicht kollidiert, sondern nu Erfindung zugrundeliegenden Prinzips Theorie angegeben ist 'X' Veröffentlichung von besonderer Bede kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung von besonderer Bede kann inicht alls auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betr: 'Y' Veröffentlichung von besonderer Bede kann nicht alls auf erfinderischer Tätig werden, wenn die Veröffentlichung mi Veröffentlichung dieser Kategone ir diese Verbindung für einen Fachmann's.' Veröffentlichung, die Mitglied dersetbe Absendedatum des internationalen Richt veröffentlichung. | t worden ist und mit der ir zum Verstandnis des der oder der ihr zugrundeliegenden uitung: die beanspruchte Erfindung chung nicht als neu oder auf achtet werden uitung: die beanspruchte Erfindung keit berühend befrachtet it einer oder mehreren anderen in Verbindung gebracht wird und in naheliegend ist in Patentlamilie ist |
| <u> </u>  | 25. August 1999 Postanscrint der Internationalen Recherchenbehorde   | 02/09/1999  Bevollmächtigter Bediensteter  |   |
|   | Europaisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   | Hagenmaier, S  |   |

1

-, -----

Inter., Jonales Aktenzeichen PCT/EP 99/00716

|                 | ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Bezeichnung der Veröffentlichung, soweil erforderlich unter Angabe der in Betracht kommend  | en Teile Betr, Anspruch Nr. |
|-----------------|--|-----------------------------|
| Kategorie       | Bezeichnung der Veroffentlichung, soweil erlorderlich unter Angabe der im Deltach Kommons  |                             |
| Y               | NAKAMURA T M ET AL: "TELOMERASE CATALYTIC<br>SUBUNIT HOMOLOGS FROM FISSION YEAST AND<br>HUMAN"<br>SCIENCE,<br>Bd. 277, 15. August 1997 (1997-08-15),<br>Seiten 955-959, XP002056803<br>ISSN: 0036-8075<br>in der Anmeldung erwähnt<br>das ganze Dokument | 1-51                        |
| Y               | WO 97 18322 A (DAHM MICHAEL W) 22. Mai 1997 (1997-05-22) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument   | 1-51                        |
| Y               | WO 96 01835 A (ANDREWS WILLIAM H; VILLEPONTEAU BRYANT (US); FUNK WALTER (US); FEN) 25. Januar 1996 (1996-01-25) das ganze Dokument   | 1-51                        |
| A               | KIM N W ET AL: "SPECIFIC ASSOCIATION OF HUMAN TELOMERASE ACTIVITY WITH IMMORTAL CELLS AND CANCER" SCIENCE,   |                             |
| and Free violes |  |                             |
| A               | BLASCO M A ET AL: "DIFFERENTIAL REGULATION OF TELOMERASE ACTIVITY AND TELOMERASE RNA DURING MULTI-STAGE TUMORIGENESIS" NATURE GENETICS, Bd. 12, Nr. 2, 1. Februar 1996 (1996-02-01), Seiten 200-204, XP000673791 ISSN: 1061-4036                         |                             |
| P,X             | das ganze Dokument  WO 98 37181 A (COUNTER CHRISTOPHER M ;WEINBERG ROBERT A (US); WHITEHEAD BIOMEDICA) 27. August 1998 (1998-08-27) das ganze Dokument   | 1-51                        |
| P,X             | WO 98 59040 A (WICK MARESA ;BAYER AG (DE); HAGEN GUSTAV (DE); WEICHEL WALTER (DE)) 30. Dezember 1998 (1998-12-30) Siehe PCR Primer C5A and GSP2 das ganze Dokument   | 1-51                        |
|                 | -/   |                             |
|                 |  | 1                           |

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)



PCT/EP 99/00716

| C.(Fortsetz | ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN   |                                  |  |  |
|-------------|---|----------------------------------|--|--|
| Kategorie   | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kon  | nmenden Teile Betr. Anspruch Nr. |  |  |
| P,X         | GB 2 317 891 A (GERON CORP ;UNIV<br>TECHNOLOGY CORP (US))<br>8. April 1998 (1998-04-08)<br>Siehe hTRT PCR Primer<br>das ganze Dokument        | 1-51                             |  |  |
| Ρ, χ        | WO 98 14592 A (ANDREWS WILLIAM H ;CECH<br>THOMAS R (US); MORIN GREGG B (US);<br>NAKAMUR) 9. April 1998 (1998-04-09)<br>das ganze Dokument<br> | 1-51                             |  |  |
|             |   |                                  |  |  |
|             |   |                                  |  |  |
|             |   | ·                                |  |  |
|             |   |                                  |  |  |
|             |   |                                  |  |  |
|             |   |                                  |  |  |
|             |   |                                  |  |  |
|             |   |                                  |  |  |
|             | ·   |                                  |  |  |
|             |   |                                  |  |  |

בניררונה הישור היהודי

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentramilie genoren

PCT/EP 99/00716

| Im Recherchenbe<br>angeführtes Patento |         | Datum der<br>Veröffentlichung |                      | glied(er) der<br>atentfamilie                     | Datum der<br>Veröffentlichung                        |
|--|---------|-------------------------------|----------------------|---|--|
| WO 9718322                             | A       | 22-05-1997                    | AU<br>CA<br>CN<br>DE | 1867397 A<br>2237589 A<br>1202206 A<br>19681033 D | 05-06-1997<br>22-05-1997<br>16-12-1998<br>18-03-1999 |
| WO 9601835                             | <br>5 A | <br>25-01-1996                | EP<br>US<br>US       | 0861334 A<br>                                     | 02-09-1998<br><br>10-12-1996<br>07-07-1998           |
|  |         |                               | AU<br>AU<br>AU       | 696702 B<br>2964795 A<br>3095095 A                | 17-09-1998<br>09-02-1996<br>09-02-1996<br>18-03-1999 |
|  |         |                               | AU<br>BG<br>BR<br>CA | 9712998 A<br>101103 A<br>9508254 A<br>2194393 A   | 31-10-1997<br>23-12-1997<br>25-01-1996               |
|  |         |                               | CN<br>CN<br>CZ<br>EP | 1158617 A<br>1168696 A<br>9700034 A<br>0778842 A  | 03-09-1997<br>24-12-1997<br>15-10-1997<br>18-06-1997 |
|  |         |                               | EP<br>FI<br>JP<br>JP | 0793719 A<br>970026 A<br>10505488 T<br>10507067 T | 10-09-1997<br>03-03-1997<br>02-06-1998<br>14-07-1998 |
| te we know a                           |         |                               | NO<br>NZ<br>PL       | 970041 A<br>289720 A<br>318169 A                  | 06-03-1997<br>29-03-1999<br>26-05-1997<br>25-01-1998 |
|  |         |                               | WO<br>US<br>US       | 9601614 A<br>5876979 A<br>5837857 A               | 02-03-1999<br>17-11-1998                             |
| WO 983718                              | 1 A     | 27-08-1998<br>                | KEIN                 | NE<br>  |  |
| WO 985904                              | 0 A     | 30-12-1998                    | AU                   | 8214998 A   | 04-01-1999   |
| GB 231789                              | 1 A     | 08-04-1998                    | AU<br>AU<br>CH       | 4803697 A<br>4807397 A<br>689672 A                | 24-04-1998<br>24-04-1998<br>13-08-1999               |
|  |         |                               | DE<br>DE<br>EP       | 19743497 A<br>841396 T<br>0841396 A               | 20-08-1998<br>24-09-1998<br>13-05-1998               |
|  |         |                               | EP<br>FI<br>FR       | 0932686 A<br>990655 A<br>2757177 A                | 04-08-1999<br>24-03-1999<br>19-06-1998               |
|  |         |                               | GB<br>JP<br>NO       | 2321642 A<br>10234384 A<br>991588 A               | 05-08-1998<br>08-09-1998<br>31-05-1999               |
|  |         |                               | WO<br>WO             | 9814592 A<br>9814593 A                            | 09-04-1998<br>09-04-1998<br>                         |
| WO 981459                              | 2 A     | 09-04-1998                    | AU<br>AU<br>CH       | 4803697 A<br>4807397 A<br>689672 A                | 24-04-1998<br>24-04-1998<br>13-08-1999               |
|  |         |                               | DE<br>DE<br>EP       | 19743497 A<br>841396 T<br>0841396 A               | 20-08-1998<br>24-09-1998<br>13-05-1998               |
|  |         |                               | EP<br>FI<br>FR       | 0932686 A<br>990655 A<br>2757177 A                | 04-08-1999<br>24-03-1999<br>19-06-1998               |

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte...Lionales Aktenzeichen
PCT/EP 99/00716

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie |  | Datum der<br>Veröffentlichung                        |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| WO 9814592 A                                       | 1                             | GB<br>GB<br>JP<br>NO              | 2317891 A.B<br>2321642 A<br>10234384 A<br>991588 A | 08-04-1998<br>05-08-1998<br>08-09-1998<br>31-05-1999 |
|  |                               | WO                                | 9814593 A  | 09-04-1998   |